

Funktionelle und morphologische Langzeiteffekte der Tiefen Hirnstimulation mit zwei Elektrodenmodifikationen im 6-OHDA-Hemiparkinson-Modell der Ratte

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock



vorgelegt von:

Kathrin Badstübner, geb. am 20. März 1980 in 08228 Rodewisch
aus Rostock

Rostock, den 23.10 2015

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Jan Gimsa

Universität Rostock

Lehrstuhl für Biophysik

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. habil. Alexander Storch

Universitätsmedizin Rostock

Klinik und Poliklinik für Neurologie

Datum der Einreichung: 23. Oktober 2015

Datum der Verteidigung: 8. April 2016

Erklärung

Ich gebe folgende Erklärung ab:

1. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.
2. Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den 23.10 2015

Kathrin Badstübner

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	i
Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abstract	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Hintergrund und Motivation	1
1.2. Die Parkinson-Krankheit	2
1.2.1. Klinische Klassifikation.....	2
1.2.2. Ätiologie und Hypothesen zur Pathogenese	3
1.2.3. Symptomatik.....	3
1.3. Neurobiologie der Parkinson-Krankheit	5
1.3.1. Anatomie und Physiologie der Basalganglien	5
1.3.2. Pathophysiologie der Basalganglien bei der Parkinson-Krankheit	8
1.3.3. Prinzipien der Neurotransmission mit Fokus auf das dopaminerge System	9
1.3.4. Neuropathologisch-anatomische Befunde der Parkinson-Krankheit	10
1.4. Tiermodelle der Parkinson-Krankheit.....	10
1.4.1. Allgemeine Forderungen an Tiermodelle	10
1.4.2. Transgene Tiermodelle	10
1.4.3. Pharmakologisch-induzierte funktionelle Störungen der dopaminergen Neurotransmission	11
1.4.4. Experimentell-induzierte Degeneration von nigro-striatalen dopaminergen Neuronen.....	11
1.4.4.1. Verhaltenstests im 6-OHDA-Modell der Ratte	12
1.5. Elektrostimulation von neuronalem Gewebe	14
1.5.1. Polarisierung von Elektroden	15
1.5.2. Charakterisierung von Elektroden mittels Impedanzspektroskopie.....	15
1.5.3. Ersatzschaltbild zur Modellierung der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone	16
1.6. Die Tiefe Hirnstimulation	18
1.6.1. Was ist Tiefe Hirnstimulation?.....	18
1.6.2. Technische und operative Grundlagen	19
1.6.2.1. Spannungs-kontrollierte vs. Strom-kontrollierte Stimulation.....	20
1.6.3. Was bewirkt die Tiefe Hirnstimulation	21
1.6.4. Tiefe Hirnstimulation als Therapie bei der Parkinson-Erkrankung	21
1.6.4.1. Auswahlkriterien für die THS bei der Parkinson-Erkrankung.....	22
1.6.4.2. Einfluss auf die Symptomatik	23
1.6.5. Geschichte und Stand der Technik zur experimentellen Tiefen Hirnstimulation.....	24

1.7. Zielstellung	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Reagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
2.2. Tiere und Haltungsbedingungen	27
2.3. Versuchsplanung	27
2.3.1. Einteilung der Versuchsgruppen	27
2.3.2. Zeit- und Ablaufplan	30
2.4. Anästhesie	31
2.5. Vor- und Nachbereitung der stereotaktischen Operationen	31
2.6. Unilaterale 6-OHDA-Läsion	33
2.7. Stimulationselektroden	33
2.8. Elektrodenimplantation	35
2.9. Stimulatorplatinen und -parameter	37
2.10. Applikation der chronischen Instrumentierung	38
2.11. Elektrische Impedanz Spektroskopie.....	40
2.12. Elektrodenimpedanz: Äquivalenzschaltkreis und Dateninterpretation	43
2.13. Die Zellkonstanten der THS-Elektroden	44
2.13.1. Experimentelle Bestimmung der Zellkonstanten	44
2.13.2. Numerische Bestimmung der Zellkonstanten	45
2.14. Verhaltenstests	45
2.14.1. Apomorphin-induzierter Rotationstest	45
2.14.2. Stepping-Test	46
2.14.3. Korridor-Test.....	47
2.14.4. Offenfeld-Test	48
2.15. Perfusion und Hirnentnahme	49
2.16. Arbeitsmethoden Histologie	50
2.16.1. Systematische Planung der histologischen Aufarbeitung von Rattenhirnen.....	50
2.16.2. Anfertigung von Kryostatschnitten	52
2.16.3. Nachweis für cholinerge und dopaminerge Neurone in Hirngewebschnitten ...	52
2.17. Untersuchung der Implantat-Gewebe-Kontaktzone	52
2.18. Statistik und Gruppengröße	54

Inhaltsverzeichnis

3. Ergebnisse	55
3.1. Lokalisationskontrolle der Zielgebiete für stereotaktische Operationen	55
3.1.1. Lokalisationskontrolle für 6-OHDA Läsionierung	55
3.1.2. ChAT-Färbung	56
3.1.3. Lokalisationskontrolle für Elektrodenimplantation	56
3.1.4. TH-Färbung	58
3.2. Etablierung der chronischen Instrumentierung	59
3.3. EIS	59
3.3.1. Elektrodeneigenschaften: Experimentelle und numerische Zellkonstanten	59
3.3.2. EIS-Messungen im Rattenhirn	60
3.4. Verhaltenstests	65
3.4.1. Umsetzung der Versuchsplanung	65
3.4.2. Lokomotorische Aktivität	65
3.4.3. Akinesie	67
3.4.4. Sensomotorischer Neglect	72
3.4.5. Ängstlichkeit	73
3.4.6. Zusammenfassung der Ergebnisse der Verhaltenstests	76
3.5. Untersuchung der Implantat-Gewebe-Kontaktzone	77
4. Diskussion	78
4.1. Verhaltenstests	78
4.2. EIS-Messung	85
5. Schlussfolgerung und Ausblick	86
6. Zusammenfassung	89
Danksagung	94
Literaturverzeichnis	97
Anhang	X
Anhang 1_ Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software	X
Anhang 2_ Reagenzien	XI
Anhang 3_ Herleitung der Dimension der Konstante $Q [Fs^{(\alpha-1)}]$	XII
Anhang 4_ Protokolle	XIII
Publikationen	XXV

Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hydroxydopamin		
a	chemische Aktivität		[mol l ⁻¹]
bzw.	beziehungsweise		
i.p.	intraperitoneal		
d.h.	das heißt		
f	Frequenz		[Hz]
n.d.	nicht definiert		
u.a.	unter anderem		[s ⁻¹]
vgl.	vergleiche		
z.B.	zum Beispiel		
z. Zt.	zur Zeit		
x	Dicke, z.B.: Membrandicke		[m]
d	Abstand, z.B. Elektrode zu Gegenelektrode		[m]
A	Oberfläche, z.B. Elektrodenoberfläche		[m ²]
AK	Antikörper		
AP	anterior-posterior		
C	Kapazität, z.B.: Kapazität der Doppelschicht C _D		
ChAT	Cholinacetyltransferase		
CM-Pf	centromediane-parafasciculäre Komplex des Thalamus, bestehend aus den beiden Kernen Centrum medianum und Nucleus parafascicularis		
CPE	Constant Phase Element		
CPu	Caudate Putamen (auch Striatum)		
CT	Computertomographie		
D	Diffusionskoeffizient		[m ² s ⁻¹]
DAB	Diaminobenzidin		
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin		
DV	dorsal-ventral		
EDX	energiedispersive Röntgenanalyse		
EIS	elektrische Impedanzspektroskopie		
F	Faradaysche Konstante	96485,3365	[C mol ⁻¹]
FDA	Food and Drug Administration		
GABA	Gamma-Aminobuttersäure		
GP	Globus pallidus		
GPe	Globus pallidus externus		
GPi	Globus pallidus internus		
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid		
I	Stromstärke		[A]
Imag	Imaginärteil der Impedanz		[Ω]
IPS	idiopathisches Parkinsonsyndrom		
L-DOPA	Levodopa (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin)		
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin		
MRT	Magnetresonanztomographie		
MVB	mediales Vorderhirnbündel		
MV	medial-ventral		
P	Permeabilitätskoeffizient	$P_i = D_i / \Delta x$	[m s ⁻¹]
PBS	Phosphate buffered Saline		

Abkürzungsverzeichnis

Pt/Ir	Platin/Iridium		
PPN	Nucleus pedunculopontinus		
PPTN	Nucleus tegmentalis pedunculopontinus		
PTg	Nucleus pedunculopontine tegmentalis		
R	Universelle Gaskonstante	8,3144621	[J mol ⁻¹ K ⁻¹]
R	elektrischer Widerstand, z.B.: Durchtrittswiderstand der Elektrode R _p		[Ω]
Real	Realteil der Impedanz		[Ω]
REM	Rasterelektronenmikroskopie		
RT	Raumtemperatur		
SN	Substantia nigra		
SNpc	Substantia nigra pars compacta		
SNr	Substantia nigra pars reticulata		
STN	Nucleus subthalamicus		
SMD	Surface Mount Device		
T	Temperatur		[K], [°C]
THS	Tiefe Hirnstimulation		
TH	Tyrosinhydroxylase		
U	Spannung		[V]
Vim	Nucleus ventralis intermedius		
ZNS	Zentrales Nervensystem		
Z*	Impedanz (Wechselstromwiderstand)		[Ω]
Real	Re, Realteil der Impedanz		
Δ	Zeichen für Differenz		
α	Faktor, der den Anstieg des linearen Abschnitts der komplexen Funktion der Impedanz beschreibt		
γ	Zellkonstante		[m]
π	Zahl Pi	3,141592	
ρ	Spezifischer elektrischer Widerstand (Resistivität)		[Ωm]
σ	Spezifische elektrische Leitfähigkeit		[Sm ⁻¹], [Ω ⁻¹ m ⁻¹]
φ	Elektrisches Potential, z.B.: Diffusionspotential Δφ		[V]
ω	Kreisfrequenz		[s ⁻¹]
∞	Zeichen für unendlich		

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Vernetzung der Basalganglien: Normalzustand.....	6
Abb. 2: Schematische Darstellung der Vernetzung der Basalganglien: Parkinson-Erkrankung.....	8
Abb. 3: Modell der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone.....	17
Abb. 4: Implantation von THS-Systemen	20
Abb. 5: Schematische Darstellung der Vernetzung der Basalganglien: THS-Therapie	22
Abb. 6: Inhaltliche und zeitliche Darstellung des Versuchsablaufs.....	30
Abb. 7: Stereotaxie.....	32
Abb. 8: Verwendete unipolare Elektroden.....	34
Abb. 9: Verwendete bipolare Elektroden.....	34
Abb. 10: Kabelkontaktierung der Elektroden	35
Abb. 11: Zielregionen für die stereotaktischen Operationen.	35
Abb. 12: Verlauf einer Elektrodenimplantations-OP	37
Abb. 13: Stimulationsparameter und Einstellung der Platinen.....	38
Abb. 14: Kontaktierung des Steckers an der Ratte	39
Abb. 15: Chronische Instrumentierung am Beispiel unipolarer THS.....	40
Abb. 16: EIS-Messungen: verwendete Gegenelektroden.....	41
Abb. 17: Messplatz für EIS- <i>in-vivo</i> -Messung	42
Abb. 18: Elektrodenreaktionen in Kalibrierflüssigkeit	43
Abb. 19: Apomorphin-induzierter Rotationstest mit „Rodent-Rotometern“	46
Abb. 20: Stepping-Test	47
Abb. 21: Korridor-Test	48
Abb. 22: Offenfeld-Test	49
Abb. 23: Schnitt- und Färb-Systematik für die histologische Beurteilung	51
Abb. 24: Von ventral präpariertes Rattenhirn mit Elektroden-Implantat-Aufbau.....	53
Abb. 25: Kontrastierung und Einbettung eines Rattenhirns	54
Abb. 26: Lokalisationskontrolle für 6-OHDA Läsionierung mittels Tinteninjektion	55
Abb. 27: ChAT-gefärbte Schnitte	56
Abb. 28: Nissl-gefärbte Schnitte zur retrospektiven Lokalisationskontrolle des Zielgebietes STN	57
Abb. 29: TH-gefärbte Schnitte	58
Abb. 30: EIS-Messungen von 4 bipolaren Elektroden.....	61
Abb. 31: Komplexe Darstellung des Impedanzverlaufs uni- und bipolarer Elektroden.....	62
Abb. 32: „Einwachskurven“ uni- und bipolarer Elektroden.....	63
Abb. 33: Individuelle „Einwachskurven“ bipolarer Elektroden	64
Abb. 34: Impedanzverlauf unipolarer Elektroden über 36 Tage	64
Abb. 35: Apomorphin-induzierter Rotationstest	66
Abb. 36: Stepping-Test, Prüfung der Bewegungsinitiationszeit der kontralateralen Vorderpfote	68
Abb. 37: Stepping-Test, Prüfung der Bewegungsinitiationszeit der ipsilateralen Vorderpfote.....	69
Abb. 38: Stepping- Test, Prüfung der Vorderpfotenbeweglichkeit in Vorhandrichtung	70
Abb. 39: Stepping- Test, Prüfung der Vorderpfotenbeweglichkeit in Rückhandrichtung.....	71
Abb. 40: Korridor-Test	72
Abb. 41: Offenfeld-Test, Prüfung der lokomotorischen Aktivität.....	74
Abb. 42: Offenfeld-Test, Prüfung des Angstverhaltens.....	75
Abb. 43: REM-Aufnahme der Implantat-Gewebe-Kontaktzone	77
Abb. 44: EDA-Analyse der Implantat-Gewebe-Kontaktzone	78
Abb. 45: Beispiel für Nissl-Färbung	XVI
Abb. 46: Beispiel für ChAT-Färbung	XIX
Abb. 47: Beispiel für TH-Färbung	XXII

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifikation der Parkinson-Syndrome	2
Tab. 2: Hypothesen zur Pathogenese der Parkinson-Krankheit	3
Tab. 3: Funktionelle Verhaltenstests bei Ratten	13
Tab. 4: Ein- und Ausschlusskriterien für die THS zur Therapie der Parkinson-Krankheit.....	23
Tab. 5: Übersicht zur Einteilung der Versuchsgruppen	29
Tab. 6: Versuchsbedingungen: EIS- <i>in-vivo</i> -Messungen.....	41
Tab. 7: Zellkonstanten	59
Tab. 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der Verhaltenstests	76

Abstract

Für die bei der Parkinsonerkrankung klinisch eingesetzte, aber noch nicht vollständig erforschte Behandlungsmethode der Tiefen Hirnstimulation (THS) wurde ein Tiermodell entwickelt. Es basiert auf der chronischen Instrumentierung vollkommen freibeweglicher Ratten und erlaubt erstmals Zeiträume von bis zu 6 Wochen zu untersuchen.

Im Modell, wurde eine vergleichende Studie mit zwei Elektrodenmodifikationen durchgeführt. Dabei wurden uni- und bipolare Platin/Iridium-Elektroden in den Nucleus subthalamicus (STN) von Ratten mit unilateraler 6-Hydroxydopamin-induzierter Läsion des medialen Vorderhirnbündels implantiert. Die THS erfolgte mit tragbaren Stimulatoren (130 Hz, 200 μ A und 60 μ s Pulsweite).

Um die Langzeit-Effekte der THS zu beurteilen, wurden geeignete Verhaltenstests zu unterschiedlichen Zeitpunkten von bis zu 6 Wochen durchgeführt. Die Tests wurden parallel an gesunden, Schein-läsionierten und Schein-THS-behandelten Tieren durchgeführt. Hierbei dienten der Apomorphin-induzierte Rotationstest, sowie drei nicht-Medikamenten-induzierte Verhaltenstests (Stepping-, Offenfeld- und Korridor-Test) der quantitativen Beurteilung des Läsions- und THS-Effektes. Es wurden insgesamt sieben Parameter bestimmt und miteinander verglichen.

Die lokomotorische Funktion wurde beurteilt anhand der: (i) Apomorphin-induzierten Rotation; (ii) Zeit bis zur Bewegungsinitiation der kontralateralen Vorderpfote, sowie der Anzahl an forcierten Seitwärtsschritten in (iii) Vor- und (iv) Rückhandrichtung im Stepping-Test; sowie zusätzlich über (vi) die zurückgelegte Wegstrecke im Offenfeld-Test. Die Beurteilung des sensomotorischen Neglects und der Ängstlichkeit erfolgte mit der Bestimmung des: (v) kontralateralen Bias im Korridor-Test und (vii) des Verhältnisses der zurückgelegten Strecke im Zentrum zur insgesamt zurückgelegten Strecke im Offenfeld-Test.

Pathologische Rotationen wurden sowohl nach 3-tägiger, als auch 3-wöchiger THS mit uni- und bipolaren Elektroden signifikant reduziert, wohingegen die Ergebnisse der 6-Wochen Studie keine Reduktion des pathologischen Rotationsverhaltens zeigten. Mit dem Stepping- und dem Korridor-Test konnten signifikante Verbesserungen der Läsions-induzierten Akinesie (gemessen an der Bewegungsinitiationszeit der kontralateralen Vorderpfote) bzw. des sensomotorischen Neglects durch den Langzeiteinsatz von STN-THS nachgewiesen werden. Die Effekte wirkten persistierend, denn sie waren auch noch nach 3-wöchiger THS-Unterbrechung anschließend an eine 3-wöchige permanente Stimulation

nachweisbar, wohingegen kontinuierliche THS über 6 Wochen zu keinen signifikanten Verbesserungen führte. Im Gegensatz dazu reduzierte sich die insgesamt zurückgelegte Wegstrecke im Offenfeld-Test durch THS. Dies deutet darauf hin, dass das Wohlbefinden der Ratten in diesem Fall durch THS beeinträchtigt war.

Von den sieben Parametern die in dieser Verhaltensstudie angewandt wurden, waren der kontralaterale Bias im Korridor-Test und die Bewegungsinitiationszeit der kontralateralen Vorderpfote für die Beurteilung therapeutischer THS-Effekte am besten geeignet. Die Beurteilung des Ängstlichkeitsverhaltens wurde von Gewöhnungseffekten konfundiert.

In einer begleitenden Studie konnten Änderungen der elektrischen Elektrodeneigenschaften während des Einwachsens mittels elektrischer Impedanzspektroskopie (EIS) charakterisiert werden. Dazu wurden die Zellkonstanten beider Elektrodenmodifikationen experimentell und numerisch bestimmt, um den effektiven spezifischen elektrischen Widerstand (Resistivität) des die Elektroden umgebenden Mediums im Zeitverlauf darzustellen.

EIS-*in-vivo*-Messungen über zwei Wochen ergaben signifikante Änderungen der Resistivität mit einem charakteristischen Abfall am 2. Tag nach der Implantation und einem Maximalwert um den 8. Tag. Die Anschaltung der THS am 8. Tag verursachte einen erneuten Abfall, ungefähr auf die Anfangswerte. Ab einem bestimmten Zeitpunkt (ca. 12. Tag) stieg die Resistivität wieder tendenziell an, vermutlich um sich auf einem Plateau einzupendeln. Bipolare Elektroden bildeten diesen Verlauf sensitiver ab als unipolare Elektroden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das vorgestellte Modell der chronischen Instrumentierung zuverlässig einsetzbar ist und eine vielfältig verwendbare Plattform zum Testen unterschiedlicher Stimulationsparameter, wie zum Beispiel neuartiger Elektroden oder unerforschter Zielgebiete darstellt. Das Modell stellt ein Instrument zur Verfügung, dass es ermöglicht Erprobungsstudien durch Langzeittierversuche zu ergänzen. Die vorgestellte stabile chronische Instrumentierung eignet sich für alle Ratten-Modelle, bei denen die klinische THS Erfolg verspricht. In Zukunft soll die Reduzierung der Stimulatorgröße zu einer weiteren Verbesserung des Tierschutzes beitragen und die Untersuchung der Wirkung von THS auch in anderen Tiermodellen, wie des Hamsters oder der Maus erlauben.

1. Einleitung

1.1. Hintergrund und Motivation

Die Parkinson-Krankheit ist eine fortschreitende neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems, die medikamentös behandelt wird. Im fortgeschrittenen Stadium können Läsions-Operationen (nicht-reversible Entfernung von Gewebe) im Gehirn zu einer Verbesserung der Symptomatik führen. Während der klassischen Läsions-Operationen wurde ein Kerngebiet des im Zwischenhirn befindlichen Thalamus zerstört, um die Parkinson-Symptome durch Unterbrechung einer fehlerhaften Verschaltung nach Ausfall der schwarzen Substanz (Substantia nigra pars compacta, SNpc) zu mildern. In diesen Operationen wurde eine Stimulationselektrode verwendet, um den genauen Läsionsort zu lokalisieren [Benabid *et al.* 1987]. Eine neuere, invasive Behandlungsmethode ist die Tiefe Hirnstimulation (THS), bei der die Kerngebiete Nucleus subthalamicus (STN) oder Globus pallidus internus (GPI) [Benabid *et al.* 1994] im tiefen Hirn elektrisch stimuliert werden. Die Basalganglien sind u. a. für die unbewusste Steuerung der Willkürmuskulatur zuständig. Ihre reversible Beeinflussung durch die THS erlaubt es inzwischen auch frühere Stadien der Erkrankung zu behandeln [Schuepbach *et al.* 2013].

Die noch während der Operation unmittelbar beobachtbaren Effekte der elektrischen Stimulation mit vorteilhaften Wirkungen für den Patienten waren der Auslöser für die Entwicklung der medizinischen THS-Therapie und die ungewöhnliche Situation des Therapieeinsatzes einer operativen Methode am Menschen ohne vorherige Versuche an einem geeigneten Tiermodell.

Dies ist sicher auch einer der Gründe dafür, dass die neuronalen Mechanismen der THS bis heute nicht richtig verstanden sind. Für die Erforschung der THS-Mechanismen und ihrer Optimierung sind deshalb Tiermodelle, wie das 6-Hydroxydopamin- (6-OHDA-) Modell der Ratte, z. Zt. noch unverzichtbar, da sich systematische invasive Untersuchungen am Menschen aus ethischen Gründen verbieten und zellbasierte *in-vitro*-Verfahren das komplexe Krankheitsbild mit den gestörten Verschaltungen der Basalganglien nicht ausreichend abbilden können [Nowak *et al.* 2011].

Der Größenunterschied zwischen den Hirnen der Ratte und des Menschen führt jedoch dazu, dass sich die Stimulationsbedingungen der klinischen Therapie nicht eins zu eins auf das Tiermodell übertragen lassen.

Um dennoch aussagekräftige experimentelle Ergebnisse zu erzielen, wurden speziell auf die Anatomie der Ratte abgestimmte Elektroden und Stimulatoren entwickelt und getestet.

Der große Vorteil der mobilen Stimulatoren liegt in der Möglichkeit erstmalig repräsentative Langzeitstudien von bis zu 6 Wochen kontinuierlicher THS an vollkommen freibeweglichen Tieren durchzuführen. Damit werden die Beschränkungen bisheriger Tierstudien, durch behindernde externe Kabelbäume, beeinträchtigende Implantate und/oder nicht-repräsentative Beobachtungszeiträume aufgehoben.

1.2. Die Parkinson-Krankheit

Die Parkinson-Krankheit (synonym: Morbus Parkinson, idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS), Parkinson's disease) ist eine der häufigsten altersabhängigen neurodegenerativen Erkrankungen mit einer Prävalenz in Deutschland von rund 0,3 % in der Gruppe der 65- bis 69-Jährigen und von rund 1,8 % in der Gruppe der 80- bis 84-Jährigen [Gerlach *et al.* 2007, Mutch *et al.* 1986]. Weltweit betrifft es 1 bis 2 % der 65-Jährigen [Ries *et al.* 2008].

1.2.1. Klinische Klassifikation

Neben der Parkinson-Krankheit unterscheidet man verschiedene Parkinson-Syndrome (Tab. 1) deren Pathogenese und Ätiologie im Gegensatz zu dieser bekannt sind.

Tab. 1: Klassifikation der Parkinson-Syndrome

Idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS)

- weitaus die häufigste Form, inklusive genetisch determinierte Formen

Idiopathische Parkinson-Plus-Syndrome, z.B.:

- Multisystem-Atrophie
- progressive supranukleäre Blicklähmung (Steele-Richardson-Olszewski-Syndrom)
- kortikobasale Degeneration
- Lewy-Körperchen-Demenz

Sekundäre (symptomatische) Parkinson-Syndrome (Pseudoparkinsonismus), z.B.:

- medikamentös bedingt (z.B. Neuroleptika, Flunarizin, α -Methyl-3,4-Dihydroxyphenylalanin)
 - traumatisch (selten, z.B. bei Boxern)
 - postenzephalitisch
 - nach Intoxikation (z.B. mit 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), Blei, Mangan, Kohlenmonoxid)
-

Modifiziert nach Gerlach *et al.* [2007].

1.2.2. Ätiologie und Hypothesen zur Pathogenese

Idiopathisch bedeutet „ohne bekannte Ursache“, d.h. zur Ätiologie der Parkinson-Krankheit kann bis heute keine Aussage getroffen werden: **Die Ursache des IPS ist weiterhin unbekannt.**

Um der Ursache auf die Spur zu kommen wurden umfangreiche epidemiologische Analysen veranstaltet. Diese ergaben, dass beispielsweise Raucher und Kaffeetrinker ein geringeres Risiko haben an IPS zu erkranken als Personen, die auf Nikotin- und Koffeinkonsum verzichten, was auf einen neuroprotektiven Effekt dieser Substanzen schließen lässt [Hernán *et al.* 2002, Barreto *et al.* 2014]. Ebenso gibt es Hinweise darauf, dass Menschen, die in Großstädten leben, ein vergleichsweise geringeres Risiko haben an IPS erkranken, als solche, die im ländlichen Umfeld zu Hause sind [Koller *et al.* 1990]. Die erhöhte Pestizid-Exposition könnte hierfür möglicherweise eine Erklärung sein [Priyadarshi *et al.* 2001]. Eine Auswahl weiterer diskutierter Ursachen für die Entstehung der Parkinson-Krankheit sind in Tab. 2 zusammengetragen:

Tab. 2: Hypothesen zur Pathogenese der Parkinson-Krankheit

-
- Alterungsprozesse [Fearnley und Lees 1991, Rodriguez *et al.* 2014, Reeve *et al.* 2014]
 - Apoptose [Graeber *et al.* 1999, Wüllner *et al.* 1999, Jellinger 2000, Lev *et al.* 2003]
 - Entzündliche Reaktionen der SN [Hirsch und Hunot 2009, Song *et al.* 2013, Fu *et al.* 2015]
 - Genetische Faktoren [Gasser 1998]
 - α -Synuklein-Mutation [Polymeropoulos *et al.* 1997]
 - Mutationen mitochondrialer Desoxyribonukleinsäure [Franco-Iborra *et al.* 2015]
 - MPTP-ähnliche Toxine [Davis *et al.* 1979, Jenner 2001, Riederer *et al.* 2002]
 - Oxidativer Stress [Janetzky *et al.* 1994, Götz und Gerlach 2004, Dias *et al.* 2013]
 - Protein-Aggregation [Chung *et al.* 2001, Taylor *et al.* 2002]
-

Modifiziert nach Gerlach *et al.* [2007].

1.2.3. Symptomatik

Bereits im Jahre 1817 wurden die grundlegenden klinischen Charakteristika der Parkinson-Krankheit durch den englischen Arzt James Parkinson (1755-1824) in seinem „Essay on the Shaking Palsy“ beschrieben.

Das klinische Bild wird durch die Kardinalssymptome: (Ruhe-) Tremor, Rigor, Bradykinese und gestörte Kontrolle der aufrechten Körperhaltung charakterisiert [Gerlach *et al.* 2007, Wöhrle und Hennerici 2004].

Der **Tremor** ist das Symptom, das den veralteten Begriff der „Schüttellähmung“ geprägt hat. Im Normalfall handelt es sich um einen Ruhetremor, der meist einseitig beginnt und bei

Bewegung der Extremität verschwindet. Die Bewegungen bei 4 bis 6 Hz sind von kleiner Amplitude und werden umgangssprachlich sehr anschaulich als „Pillendreher-Phänomen“ bezeichnet, da die typische Tremorbewegung den Abläufen beim Pillendrehen ähnelt. Studien über viele Jahre haben gezeigt [Rajput *et al.* 1991], dass fast jeder Patient im Krankheitsverlauf einen Ruhetremor entwickelt. Bei Patienten bei denen dies nicht der Fall ist sollte die Diagnose „IPS“ genau hinterfragt werden [Gerlach *et al.* 2007].

Der **Rigor**, lateinisch für „Starrheit“ beschreibt eine Muskelsteifigkeit, die dem Patienten verbietet Arbeiten in der gewohnten Weise zu verrichten, die große Anforderungen an die Feinmotorik haben, wie z.B.: Schreiben, Bastelarbeiten oder SMD-Löten. Als Frühsymptome gelten in diesem Zusammenhang neben einer verringerten Beweglichkeit nachts, die sich darin äußert, dass der Patient morgens in der gleichen Position aufwacht, die er beim Einschlafen eingenommen hat, auch eine charakteristische Veränderung des Schriftbildes. Auffällig beim Gangbild ist, dass der Arm nicht mitschwingt. Der Patient empfindet den Rigor oft als ziehenden Schmerz [Gerlach *et al.* 2007].

Die **Bradykinese** beschreibt die Verlangsamung der Initiierungszeit von Willkürbewegungen mit fortschreitender Abnahme von Geschwindigkeit und Amplitude bei sich wiederholenden Bewegungen. Akinesie (hochgradige Bewegungsarmut bis Bewegungslosigkeit) und Hypokinese (Reduktion der Bewegungsamplituden) sind spezielle Ausprägungen der Bradykinese [Gerlach *et al.* 2007].

Die **posturale Instabilität** tritt erst in den späteren Stadien des Krankheitsverlaufs auf. Das Symptom äußert sich als Pro-, Retro- oder Lateropulsion, damit ist das unfreiwillige Vor-, Rück- oder Seitwärts laufen der Patienten gemeint, weil der Schwerpunkt durch die eigentümliche Haltung und die Muskelsteifheit unausgleichbar ist. Das Auftreten dieser Symptome verheißt meist eine schlechte Prognose [Jankovic *et al.* 1990], da Dopaminergika oft nicht ansprechen. Der erfolgreiche Einsatz der in den folgenden Kapiteln noch näher betrachteten Behandlungsmethode der THS bei Symptomen, die die posturale Instabilität (und andere nicht-Dopamin-assoziierte motorische Symptome) betreffen, ist im Gegensatz zur Behandlung von Tremor, Rigor und Bradykinese immer noch umstritten [Lilleeng *et al.* 2014]. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass THS auch hier erfolgversprechend sein kann [Johnsen *et al.* 2009].

Bei der Beschreibung der Symptomatik sollte die Riechstörung nicht an letzter Stelle aufgezählt werden, denn dieses Symptom zeigt sich bei fast allen Parkinsonpatienten schon sehr frühzeitig [Doty *et al.* 1988, Sommer *et al.* 2004, Bohnen und Müller 2013].

Bei der Parkinson-Krankheit treten über die motorischen Symptome und die Riechstörung hinaus auch noch eine ganze Reihe vegetative (wie Blasenentleerungsstörungen [Lewy 1913, Jost 1999], Störungen der Sexualität [Wermuth und Stenager 1995] und der Verdauung [Martignoni *et al.* 1995], vermehrtes Schwitzen [Goetz *et al.* 1986]), kognitive und neuropsychiatrische Störungen [Dubois *et al.* 1990] auf.

1.3. Neurobiologie der Parkinson-Krankheit

1.3.1. Anatomie und Physiologie der Basalganglien

Als Basalganglien versteht man eine Gruppe von Kerngebieten, die sich unterhalb der Großhirnrinde (Cortex) befinden und die als komplexes zusammenhängendes System funktional interagieren. Dazu zählen das **Striatum**, bestehend aus dem Nucleus caudatus und dem Putamen; der **Globus pallidus** (GP), der sich durch eine innere Faserlamelle in ein externes (GPe) und ein internes (GPi) Segment gliedert; der **Nucleus subthalamicus** (STN) und die **Substantia nigra** (SN), die in die zwei Abschnitte Pars reticulata (SNr) und Pars compacta (SNpc) aufgeteilt wird. In der Literatur finden sich darüber hinaus unterschiedliche Angaben, welche Kerne im weiteren Sinne zu den Basalganglien gehören. Bei Weigel *et al.* [2004] werden hier auch das Claustrum, der Nucleus accumbens, der Nucleus ruber, die Zona incerta und der Nucleus pedunculo pontinus (PPN¹) aufgeführt.

Die Basalganglien sind eng mit dem frontalen Cortex und dem Thalamus verknüpft und steuern gemeinsam zielgerichtetes Verhalten. Das erfordert nicht nur die Umsetzung von motorischen Aufgaben, sondern erfasst auch Emotion, Motivation sowie Planungs- und Erkenntnisvermögen, die unser motorisches Handeln beeinflussen [Haber 2003].

Die genaue Funktion der Basalganglien ist bis heute nicht vollständig geklärt. Nach den Modellvorstellungen von Alexander *et al.* [1990] geht man davon aus, dass Aufgaben innerhalb von 5 teilweise überlappenden basalganglienthalamicocortikalen Regelkreisen erfüllt werden, diese sind: die motorische, die okulomotorische, die dorsolaterale präfrontale, die laterale orbitofrontale und die mediofrontale limbische Schleife.

¹ Die Bezeichnungen PPN für Nucleus pedunculo pontinus und PPTN für Nucleus tegmentalis pedunculo pontinus werden parallel verwendet.

Einleitung

Der motorische Regelkreis wurde anhand von Tiermodellen hypo- und hyperkinetischer Störungen direkt abgeleitet und gilt als der am besten erforschte [DeLong 1990, Parent und Hazrati 1995, Albin *et al.* 1995, Ceballos-Baumann 2004].

Der motorische Regelkreis wird hier exemplarisch vorgestellt und im Kapitel 1.3.2 am Beispiel der Parkinson-Erkrankung erneut aufgegriffen, um die Unterschiede zur gesunden Physiologie (Abb. 1) zu verdeutlichen. Ferner wird darauf eingegangen, wie die THS dazu beitragen kann, den gestörten Regelkreis wieder seine Bahnen zu lenken (Kapitel 1.6.4).

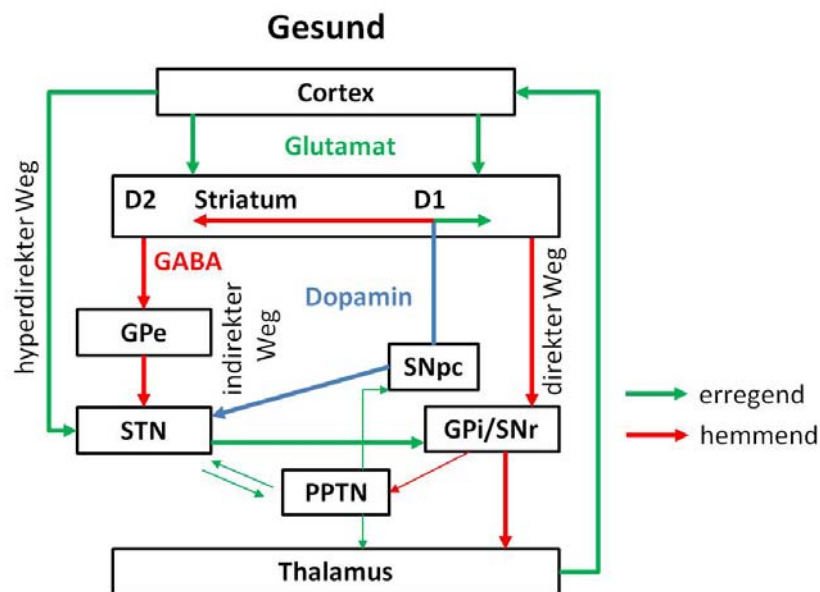


Abb. 1: Schematische Darstellung der Vernetzung der Basalganglien: Normalzustand

Modifiziert² nach Alexander *et al.* [1990], van Delden [2009] und Nambu *et al.* [2000]: Darstellung der funktionalen Organisation der Basalganglien zwischen der Eingangsstation Striatum und den Ausgangsstationen GPi/SNr, sowie ihrer Verknüpfung mit dem frontalen Cortex und dem Thalamus. Die Informationsleitung in den Basalganglien erfolgt mithilfe von Neurotransmittern wahlweise über den direkten (Striatum → GPi/SNr), den indirekten (Striatum → GPe → STN → GPi/SNr) oder den hyperdirekten Weg (Cortex → STN → GPi/SNr). Das in der SNpc produzierte Dopamin spielt dabei eine entscheidende Rolle, indem es die D1- und D2- Rezeptoren im Striatum anspricht und somit den Regelkreis in Gang setzt.

Die Eingangsstation der Basalganglien:

Das **Striatum** empfängt als sogenannte **Eingangsstation** der Basalganglien neuronale Informationen. Dazu gehören: (i) monoaminerge³ Afferenzen aus der SNpc (z.B.: Dopamin, das bei der Parkinsonerkrankung aufgrund des Untergangs der dopaminergen Zellen

² Modifiziert in Diskussion mit Herrn Dr. Eilhard Mix, Forschungslabor für experimentelle Neurologie und Neurobiologie, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock.

³ Als monoaminerg werden Nervenzellen bezeichnet, die Monoamine als Neurotransmitter freisetzen. Dazu gehören neben Dopamin auch Serotonin und Noradrenalin.

zunehmend weniger produziert wird) und (ii) glutamaterge⁴ Afferenzen aus dem Thalamus und dem Cortex.

Informationsleitung in den Basalganglien - direkter, indirekter und hyperdirekter Weg:

Über den sogenannten „direkten Weg“ projiziert eine monosynaptische Faserbahn vom Striatum aus ohne Umwege zum GPi und zur SNr. Im Falle des „indirekten Weges“ werden Signale über eine polysynaptische Verbindung vom Striatum via GPe und STN zum GPi und zur SNr weitergeleitet. Dem STN kommt bei der Informationsverarbeitung eine besondere Bedeutung zu. Der STN kann in Analogie zum Striatum ebenso als Eingangsstation fungieren und kortikale Informationen (Afferenzen vom motorischen Cortex) empfangen. Dieses Modell wird als „hyperdirekter Weg“ bezeichnet [Nambu *et al.* 2002].

Die Ausgangstationen der Basalganglien:

Der GPi und die SNr stellen die Ausgangsstationen der Basalganglien dar, deren hemmende Neurone zu spezifischen Kernen des Thalamus projizieren. Im Falle der motorischen Schleife sind das der Nucleus ventralis lateralis pars oralis und pars medialis und der Nucleus centromedianus. Diese thalamischen Kerne projizieren in der Folge erregend vor allem zum frontalen Cortex zurück. Ein kleinerer Anteil projiziert aber auch zum PPTN (funktionell vermutlich wichtig für die axiale Motorik) [Ceballos-Baumann 2004].

Funktionelle Interpretation der Informationsverarbeitungswege:

Die direkte Verbindung geht von GABAergen⁵ Neuronen des Striatums aus, die über dopaminerge D1-Rezeptoren angesprochen werden. Das Dopamin hierfür wird in den melaninhaltigen Nervenzellen der SNpc produziert. Im Normalzustand (Abb. 1) gelangen die hemmenden GABAergen Impulse dann direkt in die Ausgangsstationen GPi und SNr.

Diese beiden Strukturen wirken aufgrund ihrer GABAergen, hemmenden Wirkung auf den Thalamus als „Bremse“ thalamofrontaler Aktivität. Dopamin bewirkt also im Endeffekt eine Reduktion der hemmenden Wirkung der GABAergen Neurone im GPi und der SNr und führt somit zu einer „Lockerung der Bremse“. Dies wiederum führt zu einer Erregung kortikaler Nervenzellen durch glutamaterge Efferenzen.

⁴ Glutamaterge Nervenzellen setzen Glutamat als Neurotransmitter frei.

⁵ GABAergen Nervenzellen setzen Gamma-Aminobuttersäure (GABA) als Neurotransmitter frei.

Die indirekte Verbindung geht ebenfalls von GABAergen Neuronen des Striatums aus, die allerdings von dopaminergen D2-Rezeptoren angesprochen werden. Ihre hemmenden GABAergen Impulse gelangen in den GPe und führen zu einer Hemmung des erregenden STN was in der Folge eine Verstärkung der hemmenden Aktivität („Verstärkung der Bremse“) der Ausgangsstationen GPi und SNr nach sich zieht.

Für die Durchführung zielgerichteter und willkürlicher Bewegungen ist also entweder der „direkte“ oder der „indirekte Weg“ aktiv, während gleichzeitig der jeweils andere Weg inaktiv ist [Albin *et al.* 1995].

1.3.2. Pathophysiologie der Basalganglien bei der Parkinson-Krankheit

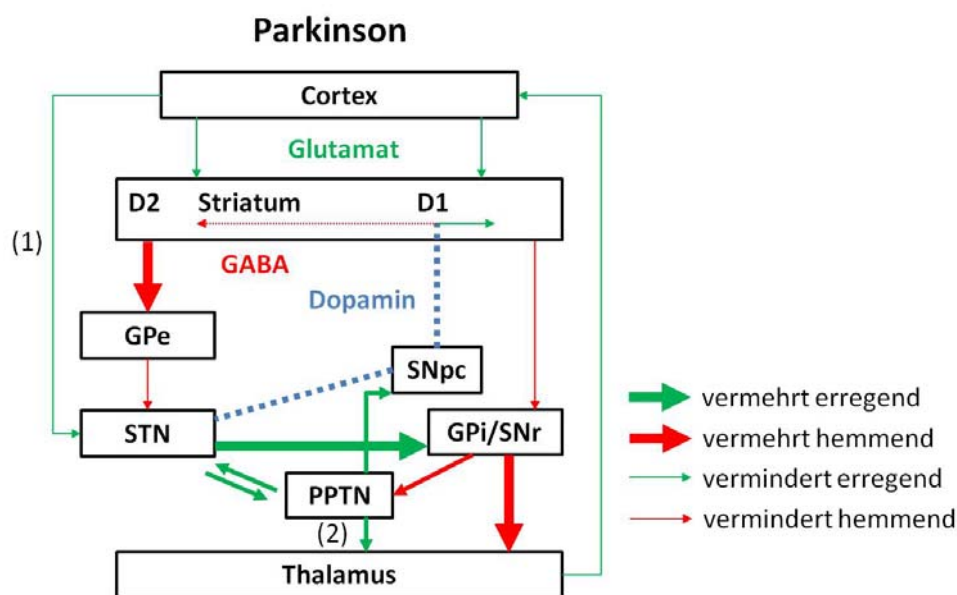


Abb. 2: Schematische Darstellung der Vernetzung der Basalganglien: Parkinson-Erkrankung

Modifiziert⁶ nach Alexander *et al.* [1990], van Delden [2009] und Nambu *et al.* [2000]: Der striatale Dopamin-Mangel führt zu einer Störung des natürlichen Gleichgewichts, indem das Regelsystem des „direkten“ und „indirekten Weges“ über D1- und D2-Rezeptoren nachhaltig verändert wird. In der Summe führt dieses Ungleichgewicht zu einer Verstärkung des „indirekten Weges“, indem die Hemmung des GPe gesteigert wird. Dadurch ist der GPe nicht mehr in der Lage die Aktivität der subthalamischen Zellen zu begrenzen, und es kommt zu einer Überaktivität des STN. Es kommt zu 2 Mechanismen der Gegenregulation gegen die verminderte Thalamus-Aktivität: (1) Verminderte STN-Aktivierung über den hyperaktiven Weg und (2) gesteigerte Stimulation des Thalamus durch den PPTN. Die THS-Therapie versucht einen weiteren Weg der Gegenregulation: vgl. (3) in Abb. 5, und zwar die THS-vermittelte Hemmung der überaktiven STN-Aktivität und somit Steigerung der PPTN-Aktivität.

Bei der Parkinsonerkrankung gehen die Dopamin-produzierenden Zellen zugrunde [Hornykiewicz 1998, 2006], was einen striatalen Dopamin-Mangel zur Folge hat. Damit wird

⁶ Modifiziert in Diskussion mit Herrn Dr. med. Eilhard Mix, Forschungslabor für experimentelle Neurologie und Neurobiologie, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock.

das natürliche Gleichgewicht gestört und das Dopamin-gesteuerte Regelsystem des „direkten“ und „indirekten Weges“ über D1- und D2-Rezeptoren verändert (Abb. 2).

In der Folge des striatalen Dopamin-Mangels kommt es gleichzeitig zu einer Verminderung der:

- erregenden Wirkung des Dopamins auf dem „direkten Weg“ und
- hemmenden Wirkung des Dopamins auf dem „indirekten Weg“.

In der Summe führt dieses Ungleichgewicht zu einer Verstärkung des „indirekten Weges“, indem die Hemmung des GPe gesteigert wird. Dadurch ist der GPe nicht mehr in der Lage die Aktivität der subthalamischen Zellen zu begrenzen und es kommt zu einer Überaktivität des STN.

1.3.3. Prinzipien der Neurotransmission mit Fokus auf das dopaminerge System

Die Nervenzelle als elementare Signalübertragungseinheit des Zentralen Nervensystems (ZNS) stellt gleichzeitig Sende- und Empfangseinheit dar. Über Synapsen kommuniziert die Nervenzelle mit anderen Nervenzellen. Der Funktionsmechanismus beruht entweder auf chemischer oder elektrischer Natur. Chemische Synapsen sind morphologisch durch einen sogenannten synaptischen Spalt getrennt und vermitteln sowohl erregende als auch hemmende Signale. Neurotransmitter sind Botenstoffe und regeln auch die Kommunikation der basalganglionären Neurone, dazu gehören u.a.: Acetylcholin, Glutamat, GABA und Dopamin. Glutamat ist ein erregender Neurotransmitter, während GABA eine hemmende Wirkung hat. Dopamin wird in den Zellen der SNpc synthetisiert und bindet an unterschiedliche Rezeptortypen (D1 und D2). Somit ruft es sowohl erregende als auch hemmende Wirkungen hervor, weswegen ihm eine modulatorische Funktion innerhalb der basalganglionären Regelkreise zugeordnet wird. Bindet Dopamin an D1-Rezeptoren, ruft es über den „direkten Weg“ eine gesteigerte Aktivität striataler GABAerger Zellen hervor, bindet es an die D2-Rezeptoren des Striatums, hat das eine hemmende Wirkung auf dem „indirekten Weg“ zur Folge (vgl.: Abb. 1) [Gerfen 1995, Wichmann und DeLong 2003, Gerlach *et al.* 2007].

Der Mangel an Dopamin bewirkt in der Folge einen Überschuss an Acetylcholin. Aber auch die Spiegel anderer Neurotransmitter können sich verändern, so dass das Gleichgewicht des Transmitterhaushaltes gestört ist. Dies führt zu verschiedenartigen neurologischen Störungen, die insbesondere die Motorik beeinträchtigen, aber auch Einfluss auf vegetative oder kognitive Funktionen haben (vgl. Kap. 1.2.3.).

1.3.4. Neuropathologisch-anatomische Befunde der Parkinson-Krankheit

Seit den Arbeiten des russischen Neuropathologen Konstantin Nikolaevitch Tretiakoff (1892 - 1958) ist bekannt, dass die Parkinson-Krankheit mit dem Untergang der Neuromelanin-haltigen, nigro-striatalen Neuronen zusammenhängt [Tretiakoff 1919, Gerlach *et al.* 2007]. Durch den fortschreitenden Verlust an dopaminergen Neuronen in der SNpc kommt es in der Folge zu einem Mangel des Überträgerstoffs Dopamin [Carlsson *et al.* 1957, Forno 1996]. Die Parkinson-Krankheit ist aber keinesfalls eine reine Dopamin-Mangel-Krankheit. Ein weiterer wichtiger neuropathologischer Befund ist der Nachweis von Lewy-Körperchen, die erstmals von den deutschen Neuropathologen Friedrich Heinrich Lewy (1885 - 1950) beschrieben wurden [Lewy 1913]. Man geht davon aus, dass bei Patienten mit einem klinisch manifesten IPS bereits ca. 60 % der dopaminergen Neurone in der SNpc zugrunde gegangen sind [Bernheimer *et al.* 1973, Riederer und Wuketich 1976]. Aus dieser Tatsache leitet sich die Notwendigkeit ab, nach Früherkennungsmethoden und Medikamenten zu forschen, die diesen Zellverlust rechtzeitig verhindern.

1.4. Tiermodelle der Parkinson-Krankheit

1.4.1. Allgemeine Forderungen an Tiermodelle

In der experimentellen Medizin sind Tiermodelle menschlicher Erkrankungen nach wie vor von großer Bedeutung, da sich *in-vivo* Untersuchungen am Menschen aus ethischen Gründen verbieten und die komplexen Vorgänge, wie die der Verschaltungen der Basalganglien *in-vitro* gar nicht abgebildet werden können. Ein Tiermodell sollte nach [Gerlach *et al.* 2007] die folgenden Merkmale aufweisen:

- Abbildung der zu untersuchenden Symptome und der pathologischen, sowie pathophysiologischen Merkmale der menschlichen Erkrankung (Gültigkeit der Erscheinungsform).
- Basis auf einer theoretisch-durchdachten Grundlage, wobei sich der Experimentator der Beschränkungen seines Modells bewusst sein muss (Konstrukt-Gültigkeit).
- Prognose von Annahmen über den Zusammenhang realer Sachverhalte (Vorhersage-Gültigkeit).

1.4.2. Transgene Tiermodelle

Molekularbiologische Techniken erlauben es, dass bestimmte Gene, die aus Genmutationen familiärer Formen der Parkinsonerkrankung bekannt sind

[Holthoff *et al.* 1994, Baik *et al.* 1995, Polymeropoulos *et al.* 1997], entweder ausgeschaltet oder überexprimiert werden. Damit kann der Phänotyp hinsichtlich Parkinson-relevanter Veränderungen untersucht werden. Transgene Tiermodelle existieren vor allem für die Maus. Eine gute Übersicht zeigen Gerlach *et al.* [2007]. Für die vorliegende Arbeit kamen solche Tiermodelle nicht in Frage. Gründe dafür sind unter 1.4.4 näher erläutert.

1.4.3. Pharmakologisch-induzierte funktionelle Störungen der dopaminergen Neurotransmission

Die systemische Verabreichung von Reserpin ist ein experimentelles Verfahren zur Induktion einer Akinesie bei Nagetieren. Der Wirkmechanismus ist nicht gänzlich erforscht, man geht jedoch davon aus, dass Reserpin präsynaptisch die vesikuläre Speicherung von Dopamin verhindert [Haefely 1978]. Heutzutage wird Reserpin kaum noch verwendet, da es unspezifisch alle monoaminergen Neurotransmitter freisetzt und dieser Effekt nicht auf das ZNS begrenzt ist [Gerlach *et al.* 2007]. Ähnliche Symptome lassen sich durch Neuroleptika hervorrufen, die die Stimulation postsynaptischer Dopamin-Rezeptoren verhindern [Schmidt *et al.* 1992].

1.4.4. Experimentell-induzierte Degeneration von nigro-striatalen dopaminergen Neuronen

Der große Vorteil des Einsatzes von Neurotoxinen gegenüber der systemischen Gabe von Reserpin und Neuroleptika liegt in ihrer Selektivität. Die Induktion führt gezielt zu einer Schädigung der dopaminergen Zellen des nigro-striatalen Systems und in der Folge zu einem Dopamin-Defizit. Der neuropathologische Effekt und die Ausprägung der Symptomatik unterscheiden sich je nach Art des verwendeten Neurotoxins und der verwendeten Modell-Tierart. Zu den verbreitetsten Neurotoxinen gehören: 6-OHDA, Methamphetamin, MPTP und Eisen(III)-Salze [Gerlach *et al.* 2007]. Einige Neurotoxine werden direkt mittels stereotaktischer Operationen eingebracht, z.B.: 6-OHDA. Diese Applikationsmethode bietet den Vorteil, dass die Läsionen auch unilateral, d.h. lediglich auf einer Hirnhälfte ausgeführt werden können.

Mithilfe anschließender Verhaltenstests kann dann die gesunde mit der betroffenen Körperseite direkt verglichen und die Effektivität neuer Therapieansätze beurteilt werden. Teil der Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war es eine vergleichende Studie uni- und bipolarer THS-Elektroden durchzuführen, um deren therapeutisches Potential abzuschätzen. Aus Kosten- und Praktikabilitätsgründen (z.B.: Implementierung der chronischen

Instrumentierung) wurde die Ratte als Modelltier für dieses Vorhaben gewählt. Damit schloss sich aufgrund der artspezifischen Empfindlichkeitsunterschiede der neurotoxischen Wirkung von MPTP die Verwendung dieser Substanz aus. Ratten weisen im Vergleich zu Affen eine relativ geringe MPTP-Neurotoxizität auf [Gerlach *et al.* 1991]. Die Gabe von Methamphetamin schloss sich wegen seiner schlechten Verfügbarkeit und der mangelnden motorischen Defizit-Symptomatik aus. Aufgrund dieser Gründe und der ebenfalls guten Verfügbarkeit bot sich das 6-OHDA Modell der Ratte als Plattform der hier durchgeführten Versuche an.

1.4.4.1. Verhaltenstests im 6-OHDA-Modell der Ratte

Als Verhaltenstests wurden der Apomorphin-induzierte Rotationstest und drei nicht-medikamenteninduzierte Tests: der Stepping-, der Offenfeld- und der Korridor-Test gewählt.

Mit dem Apomorphin-induzierten Rotations-Test nach Ungerstedt und Arbuthnott [1970] wird die Bewegungseinschränkung nach einseitiger Läsionierung des nigro-striatalen dopaminergen Systems [Ungerstedt 1968] erfasst, indem die asymmetrische Körperbeweglichkeit nach Gabe eines direkten Dopaminagonisten gemessen wird. Zur Rotation kommt es aufgrund der Hypersensitivität der Post-Synapsen auf der läsionierten Seite. Eine systemische Applikation aktiviert in der Folge die geschädigte Seite deutlich stärker, was zu einer Rotation in die Gegenrichtung d.h. von der Läsionsseite weg führt [Ungerstedt *et al.* 1969]. Obwohl der Rotations-Test eine etablierte und gut quantifizierbare Methode insbesondere zur Einschätzung des Läsionserfolges ist, ist seine Relevanz für die Parkinsonsymptomatik umstritten. Potentielle THS-Effekte können mit diesem Test theoretisch nicht abgebildet werden, da THS keine Auswirkungen auf die Hypersensitivität der Dopamin-Rezeptoren haben dürfte [Chang *et al.* 2003].

Unter anderem deshalb wurde von Schallert *et al.* [2000] und Olsson *et al.* [1995] der Stepping-Test eingeführt, mit dem das bis dahin ungenügend erfasste Kardinalsymptom Bradykinese im Hemiparkinsonmodell der Ratte quantitativ untersucht werden kann. Der Stepping-Test erfasst Änderungen der Bewegungsinitiationszeiten der Vorderpfoten und ist deshalb ein gutes Modell für zwei der Hauptsymptome der Parkinsonerkrankung: des Rigors und der Akinesie, bzw. deren leichteren Form: der Hypokinesie, aber auch der Bradykinesie.

6-OHDA-geschädigte Hemiparkinson-Ratten weisen neben motorischen auch sensorische Defizite auf [Schwartz und Huston 1996]. Das äußert sich z. B. in einem kontralateral zur Läsionsseite auftretenden Neglect, der u. a. zur bevorzugten Futteraufnahme auf der

ipsilateralen Seite führt. Diesen Umstand nutzten Dowd *et al.* [2005] für die Entwicklung eines Funktionstest auf sensomotorische Integration. Deshalb wurde der Korridor-Test in der vorliegenden Arbeit herangezogen, um den sensomotorischen Neglect und dessen THS-bedingte Therapieeffekte zu quantifizieren.

Mit dem erstmals von Hall und Ballachey [1932] beschriebenen Offenfeld-Test werden mehrere, sich teilweise überlagernde motorische, kognitive und emotionale Funktionen, wie Bewegungsdrang, Erkundungsverhalten und Ängstlichkeit der Versuchstiere erfasst [Walsh und Cummins 1976], weshalb er zahlreiche Modifikationen und Auswertungsvarianten erfuhr [DeFries *et al.* 1966, Denenberg 1969, Eikelis und Van Den Buuse 2000]. Der Offenfeld-Test wurde durchgeführt, um zum einen läsionsbedingte Motordefizite und THS-bedingte Therapieeffekte und zum anderen Effekte der Läsion und der THS auf die Emotionalität, d. h. auf das Angst- und explorative Verhalten der Versuchstiere zu erforschen. Der Offenfeld-Test ist ein Maß für die Umsetzung motivierten Verhaltens in motorische Abläufe. In Assoziation zur Klinik können damit Depressionen und Angstzustände untersucht werden.

Tab. 3: Funktionelle Verhaltenstests bei Ratten

Funktioneller Verhaltenstest	Testparameter im Tiermodell	Assoziation zur klinischen Symptomatik bei der Parkinsonerkrankung
Apomorphin-induzierter Rotationstest	allg. motorische Aktivität bzw. die asymmetrische Körperbeweglichkeit nach Gabe eines direkten Dopaminagonisten	Medikamenten-induzierte Dyskinesien
	Beurteilung der Läsionsstärke	
	Beurteilung des therapeutischen Effektes	Bradykinesie
Stepping- Test	Allg. Änderung der Vorderpfotenbeweglichkeit	
	Initiierungszeit Pfote	Rigor
	Schrittzahl bei passiver Seitwärtsbewegung in Vor- und Rückhandrichtung	Akinesie, Hypokinesie und Bradykinesie
Offenfeld-Test	Lokomotorik (motorische Aktivität und räumliches Aufenthaltsmuster)	Akinesie
	Emotionalität (exploratives Verhalten und Angstverhalten)	Depression und Angststörungen
Korridor-Test	sensomotorischer Neglect	Keine

Pathologische Bewegungseinschränkungen nach 6-OHDA-induzierter Läsion in Assoziation zur klinischen Symptomatik bei der Parkinsonerkrankung.

1.5. Elektrostimulation von neuronalem Gewebe

Elektroden vielfältiger Formen und Materialien werden in einem breiten Spektrum medizintechnischer Anwendungen eingesetzt. Dabei versteht man unter dem Begriff der Elektrode ein elektrisch leitendes Implantat oder ein auf die Haut aufgebrachtes Objekt, das zusammen mit einer Gegenelektrode im dazwischen liegendem Gewebe elektrische Ströme erzeugen oder ableiten kann. In der vorliegenden Arbeit wurden intrazerebral implantierte Elektroden für THS verwendet. Neuronale Signale können von diesen Elektroden generiert oder blockiert werden. Ein außerhalb des Neurons applizierter negativer Stromimpuls ist in der Lage das Ruhemembranpotenzial einer Nervenzelle (ca. -70mV) bis zu der Schwelle zu depolarisieren, an der ein Aktionspotential ausgelöst wird [Krauss *et al.* 2004]. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass sich die synaptische Aktivität auch ohne die Generierung fortlaufender Aktionspotentiale anregen lässt [Rattay 1999].

Das Ruhemembranpotential entspricht in guter Näherung dem Diffusionspotential $\Delta\varphi$ der Zelle und wird für einwertige Ionen nach der Goldman-Gleichung [Goldman 1943, Glaser 1996] berechnet:

$$\Delta\varphi = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{\sum_{\text{Anionen}} P_A a_A^i + \sum_{\text{Kationen}} P_K a_K^e}{\sum_{\text{Anionen}} P_A a_A^e + \sum_{\text{Kationen}} P_K a_K^i} \quad (1)$$

wobei sich die Indizes i und e auf das Innere, bzw. das Äußere der Zelle beziehen. a , R , T und F stehen für die: chemische Aktivität, Universelle Gaskonstante, Temperatur und Faradaysche Konstante.

Grundsätzlich erregt ein elektrischer Stimulus schnellleitende, dick-myelinisierte Axone eher als dünne nicht-myelinisierte Fasern oder Zellkörper, Axone an der Kathode eher als Axone an der Anode. Auch die Orientierung der Zellkörper und Axone in Bezug auf den Stromfluss ist wichtig. Für ein Axon ist die Komponente des Spannungsverlaufs parallel zur Faser ausschlaggebend [Ranck 1975, Rattay 1999]. Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, welche neuronalen Elemente in welchem Maße beeinflusst werden [Miocinovic und Grill 2004]. Die Stromstärke und die Dauer eines Einzelimpulses sind wichtige Kenngrößen, die beeinflussen, welche neuronalen Elemente in welcher Entfernung von der Elektrode erregt werden. Bei der Stimulation in einem isotropen Medium wäre das Feld bei einer monopolen Stimulation in Abhängigkeit von der Elektrodengeometrie gleichmäßig um die Elektrode verteilt. Die Stromdichte würde mit zunehmender Entfernung von der Elektrode abnehmen. In der Realität weist Hirngewebe jedoch eine komplexe anisotrope Struktur auf,

wobei es an den Grenzflächen (z.B.: Übergang von grauer zu weißer Substanz) zu Änderungen im Feldverlauf kommt [Foster und Schwan 1989, Krauss *et al.* 2004]. Wissenschaftliche Arbeiten [McIntyre *et al.* 2004, Schmidt und van Rienen 2012] beschäftigen sich aus diesem Grund mit Modellierungen zur Anisotropie des Hirngewebes, um Anhalt über realistische Feldverteilungen bei THS in den Zielgebieten (z.B.: STN und GPI bei der Parkinsonerkrankung) zu erhalten.

1.5.1. Polarisation von Elektroden

Wird zwischen einer implantierten THS-Elektrode und einer Gegenelektrode eine Spannung anlegt, bildet sich an der Implantat-Gewebe-Schnittstelle eine elektrische Doppelschicht von fixierten Ladungen und elektrostatisch angezogenen Gegenladungen beweglicher Ionen aus⁷. Diese ursprünglich von Helmholtz erarbeitete Vorstellung gilt nur für den Fall extrem hoher Ionenkonzentrationen in der Lösung. Im Allgemeinen wird durch die thermische Bewegung ein großer Teil der Ionen aus der Position nahe der Grenzschicht herausgestoßen. Es bildet sich eine diffuse Doppelschicht, mit einem elektrischen Potential, das mit wachsendem Abstand von der Grenzfläche exponentiell abfällt [Glaser 1996, Hamann und Vielstich 2005]. Eine weitere Abweichung von der starren Doppelschicht wird durch Adsorption von Ionen, Dipolen und neutralen Molekülen an den Metalloberflächen der Elektroden verursacht [Hamann und Vielstich 2005]. Für ein bestimmtes Potential (Gleichgewichtspotential) existiert an der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone ein elektrochemisches Gleichgewicht. Bei weiterer Erhöhung der Potentialdifferenz wird das Elektrodengleichgewicht gestört und es fließt ein elektrischer Strom. Der Betrag der Abweichung des Elektrodenpotentials (bei dem der Strom fließt) vom Gleichgewichtspotential wird Überspannung genannt [Hamann und Vielstich 2005].

1.5.2. Charakterisierung von Elektroden mittels Impedanzspektroskopie

Die elektrische Impedanzspektroskopie (EIS) ist eine bewährte, zerstörungsfreie Messmethode zur Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften von Geweben [Foster und Schwan 1989] und deren Schnittstellen zu elektrisch leitfähigen Elektroden [Barsoukov und Macdonald 2005]. EIS wird in einem breiten Spektrum medizintechnischer Anwendungsbereiche genutzt, wie zum Beispiel der Detektion von Brustkrebstumoren

⁷ Taucht man eine Metallelektrode in eine Lösung mit den entsprechenden Metallionen, so bildet sich die Doppelschicht bereits ohne anlegen einer Spannung aus.

[Kerner *et al.* 2002] und der Messung des Lungenvolumens [Adler *et al.* 1997]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde EIS zur Charakterisierung der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone herangezogen, um den Einwachsprozess der hier verwendeten Elektroden zu charakterisieren.

Generell tragen zur Überspannung (siehe 1.5.1) einer Elektrodenreaktion alle Teilschritte des elektrochemischen Gesamtprozesses, wie Stofftransport, Adsorption, Elektronendurchtritt und Diffusion bei. Im Gleichstromkreis kommt es damit zu einer Erhöhung des Elektrolytwiderstands. Im Wechselstromkreis wird aber zwischen ohmschen Widerständen und Wechselstromwiderständen unterschieden. Nur rein ohmsche Widerstände wie der Elektrolytwiderstand und der Durchtrittswiderstand R_D sind frequenzunabhängig. Alle anderen Wechselstromwiderstände sind frequenzabhängig und werden Impedanzen (Symbol Z^*) genannt. Dazu kommt noch die frequenzabhängige Doppelschichtkapazität. Der generelle Ansatz von EIS ist es, einen elektrischen Stimulus (einen bekannten Strom oder eine bekannte Spannung) auf die Elektrode zu übertragen und die Antwort (den resultierenden Strom oder die resultierende Spannung) zu analysieren [Barsoukov und Macdonald 2005].

1.5.3. Ersatzschaltbild zur Modellierung der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone

Die Phasengrenze an der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone lässt sich modelhaft mit einem elektronischen Schaltkreis vergleichen, der mit einer bestimmten Kombination von Kapazitäten und Widerständen beschrieben werden kann (Abb. 3B). Eine Kapazität repräsentiert dabei Polarisation von Ladungen und Adsorptionsvorgängen, ein Widerstand beschreibt die Leitfähigkeit des die Elektrode umgebenden Mediums (Bulkmedium) [Habel 2004, Gimsa *et al.* 2005]. Die Einflüsse der Elektrode können als sogenanntes “constant phase element” (CPE) zusammengefasst werden. Phänomenologisch beschreibt das CPE die frequenzabhängige Impedanz der Elektrodenprozesse (Abb. 3A) [Abouzari *et al.* 2009, Jorcin *et al.* 2006]. Aus elektronischer Sicht steht das CPE für ein Schaltelement innerhalb eines Ersatzschaltbildes, das eine Kaskade hintereinandergeschalteter Widerstands-Kapazitäts-Paare darstellt, um das Verhalten der Elektrode und der elektrischen Doppelschicht zu modellieren [Macdonald und Kenan 1987].

Wenn Z^* mit einer Nullvorspannung gemessen wird, können der Durchtrittswiderstand R_D und die Kapazität der Doppelschicht C_D vernachlässigt werden [Gimsa *et al.* 2005]. In

diesem Fall kann das CPE mathematisch wie folgt beschrieben werden [Bisquert *et al.* 1998, Minnikanti *et al.* 2010]:

$$Z_{CPE}^* = \frac{1}{Q(j\omega)^\alpha} \quad (2)$$

ω ist die Kreisfrequenz mit $2\pi f$ und $j = \sqrt{-1}$. Q ist eine Konstante mit der Dimension⁸ $Fs^{(\alpha-1)}$, wobei $0 < \alpha < 1$. α beschreibt den Anstieg des linearen Abschnitts der komplexen Funktion. Die Grenzfälle $\alpha = 0$ und $\alpha = 1$ beschreiben ein rein ohmsches, bzw. kapazitives Verhalten. Für $\alpha = 0,5$ ergibt sich das Warburg-Element, dass ausschließlich zur Beschreibung diffusionsbeeinflusster Vorgänge verwendet wird [Habel 2004] und welches sich über einen konstanten Phasenwinkel von 45° über einen größeren Frequenzbereich auszeichnet [Hamann und Vielstich 2005]. Beobachtet wurde dies bereits [1899] von Warburg an Quecksilber-Elektroden.

Die grafische Darstellung von Real- gegen Imaginärteil wird als komplexe Auftragung bezeichnet (Abb. 3A). Zur Interpretation der Messung wird ein Ersatzschaltbild (wie in Abb. 3B) aufgestellt, das die gemessene Frequenzabhängigkeit möglichst realitätsgerau wiedergeben soll. Der charakteristische Halbkreis beschreibt die Eigenschaften des die Elektrode umgebenden Mediums (Bulk: wässriges Milieu und Gewebe), die Gerade repräsentiert Elektrodeneffekte.

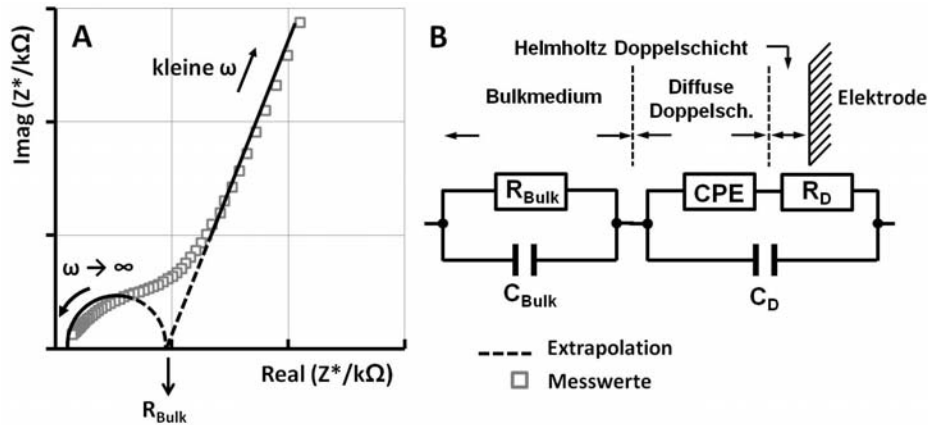


Abb. 3: Modell der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone

(A) Komplexe Darstellung der Impedanz Z^* . Das Diagramm verdeutlicht die Möglichkeiten unterschiedlicher Fitting-Methoden: Die Extrapolation der Geraden zu hohen Frequenzen hin, bzw. die des Halbkreises zu niedrigen Frequenzen hin um den Widerstand R_{Bulk} zu ermitteln. (B) Ersatzschaltbild der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone. R_{Bulk} und C_{Bulk} beschreiben die Eigenschaften des Bulkmediums, das CPE erfasst die Einflüsse der Elektrodeneffekte und der elektrischen Doppelschicht auf die Systemimpedanz. Wenn die Impedanz Z^* mit einer Nullvorspannung gemessen wird, können der Durchtrittswiderstand R_D und die Kapazität der Doppelschicht C_D vernachlässigt werden [Gimsa *et al.* 2005].

⁸ Eine Herleitung der der Dimension $Fs^{(\alpha-1)}$ kann Anhang 3 entnommen werden.

Da Elektrodeneffekte in der Realität nicht ausschließlich durch diffusionsbeeinflusste Vorgänge bestimmt werden, sondern z.B. auch durch Adsorptionsvorgänge an der Elektrodenoberfläche beeinflusst werden, weicht die Steigung gemessener Elektroden von der 45°-Geraden des Warburg-Elementes ab. Ein steiler Kurvenverlauf indiziert eine hohe Doppelschichtkapazität und einen geringen Durchtrittswiderstand der Elektrode. Eine Verbreiterung des Halbkreisdurchmessers in x-Richtung indiziert eine Erhöhung des Widerstandes des Mediums, eine Deformation in y-Richtung bedeutet eine Erhöhung der Kapazität desselben.

1.6. Die Tiefe Hirnstimulation

1.6.1. Was ist Tiefe Hirnstimulation?

Die THS ist ein invasives, aber im Gegensatz zu den abtragenden chirurgischen Eingriffen (z.B.: Thermoablation) reversibles Verfahren ohne Läsion der Zielregion. Dabei werden Elektroden zur direkten Stimulation von Hirngewebe implantiert. Angesteuert werden die Elektroden über einen Impulsgenerator (Stimulationseinheit), der kontinuierliche hochfrequente (130-150 Hz) elektrische Impulse appliziert. Die Vorteile der THS gegenüber Läsionsverfahren ist deren Reversibilität und die Möglichkeit Stimulationsparameter zu variieren [Benabid *et al.* 1987]. Darüber hinaus zeigt das Verfahren eine geringe Morbidität [Collins *et al.* 2010, Kiss 2009, Ward *et al.* 2010]. Zielregionen für die stereotaktischen Operationen sind die gleichen, wie sie auch bei den ablativen Verfahren gewählt werden. Es handelt sich um Areale im Thalamus und in den Basalganglien, wobei die Indikationen zur THS weit über die Therapie der Parkinsonerkrankung hinausgehen. Zugelassen ist die THS in Europa bereits für den essentiellen Tremor und mehrere Formen der Dystonie [Kupsch *et al.* 2003, Schrader *et al.* 2009, Sixel-Döring *et al.* 2009]. Gegenwärtig kommen in rascher Folge weitere Indikationsgebiete hinzu, wie z. B. die Epilepsie, die Huntington-Erkrankung, das Tourette-Syndrom, Zwangshandlungen und die Depression [Bartsch 2007], aber auch chronische Schmerzzustände, Drogenabhängigkeit und die Alzheimer-Erkrankung [Gubellini *et al.* 2009, Krack *et al.* 2010, Ward *et al.* 2010) werden diesbezüglich erforscht. Da jeder Erkrankung ein spezifischer Wirkmechanismus zugrunde liegt, werden unterschiedliche Erkrankungen bzw. Erkrankungssymptome durch die Stimulation unterschiedlicher Zielregionen behandelt. Die Auswahl erfolgt dabei überwiegend empirisch, z.B. anhand experimenteller Tiermodelle oder auf Erfahrungswerten beruhend. Bei der Parkinsonerkrankung sind die Zielgebiete derzeit der STN und der GPi in den Basalganglien,

sowie der centromediane-parafasciculäre (CM-Pf) Komplex des Thalamus. Bei essentiellen Tremor und Dystonie wird der Nucleus ventralis intermedius (Vim) des Thalamus stimuliert. Zwangshandlungen werden mit der Stimulation des Nucleus accumbens behandelt [Kempf *et al.* 2009, McCracken und Grace 2009, Volkmann 2009]. Neue Zielregionen, wie der pedunculo-pontine nucleus (PPTN) werden erforscht [Jenkinson *et al.* 2009]. Unerwünschte Nebenwirkungen der pharmakologischen oder ablativen Therapien können mit der THS zum Teil vermieden werden. Jedoch treten bei der THS auch neue Nebenwirkungen, wie Missempfindungen, ungewollte Bewegungen (Dyskinesien) oder Sehstörungen auf, deren Ausmaß gegen den Nutzen einer günstigen Beeinflussung der Krankheitsgrundsymptome abgewogen werden müssen. Große Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang der Positionierungsgenauigkeit der Elektrode während der stereotaktischen Operation zu. Durch die Einstellung optimaler Stimulationsparameter (Frequenz, Pulsform, -dauer und -stärke) können Nebenwirkungen minimiert und der Therapieeffekt maximiert werden. Nach Volkmann [2006] scheint die optimale Impulsstärke den größten Einfluss zu haben.

1.6.2. Technische und operative Grundlagen

Die Implantation von THS-Elektroden erfordert einen stereotaktischen Eingriff. Im Zuge des Eingriffs werden Pt/Ir-Elektroden meist bilateral in spezifische Hirnareale implantiert und über ein subkutanes Kabel mit einer Stimulationseinheit verbunden. Diese wird ähnlich einem Herzschrittmacher subkutan auf den großen Brustmuskel platziert (Abb. 4B). Während des 4- bis 8-stündigen Eingriffs ist der Patient zwar leicht sediert, aber bei vollem Bewusstsein. Lediglich Kopfhaut und Schädel werden lokal betäubt. Das ist möglich, da das Gehirn über keine Schmerzrezeptoren verfügt und nötig, da der Operateur gemeinsam mit dem Patienten bestimmen muss, wann die optimale Positionierung der Elektrode und damit die optimale Linderung der Symptome erreicht ist. Der Patient wird zunächst in einen sogenannten Stereotaxierahmen eingespannt, um eine fixierte Haltung zu gewährleisten. Mittels Magnetresonanztomographie (MRT) und/oder Computertomographie (CT) werden Aufnahmen des Gehirns gemacht, um die Zielregion zu lokalisieren. Der Operateur führt zunächst Teststimulationen mit Testelektroden in verschiedenen Bereichen innerhalb der Zielregion durch, um die optimale Position für die Platzierung der Elektrode zu bestimmen. Wurde diese anhand der Symptomlinderung lokalisiert, wird die endgültige Elektrode eingeführt und durch eine in das Loch in den Schädel eingesetzte Bohrlochkappe fixiert. Der Patient wird nun stärker sediert, um die Steuereinheit und das subkutane Kabel zu

implantieren. In der Regel darf der Patient das Krankenhaus schon nach 24 bis 48 Stunden verlassen. Einige Tage nach dem Eingriff wird der Neurostimulator - feinabgestimmt auf die Reaktionen des Patienten - per Fernbedienung programmiert.

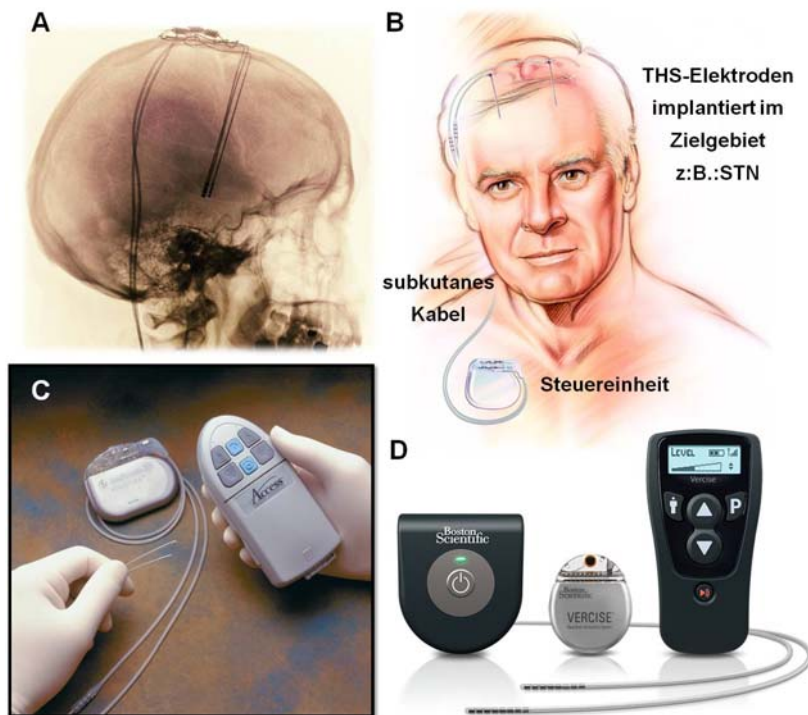


Abb. 4: Implantation von THS-Systemen

(A) Sagittale Röntgenaufnahme eines 58-jährigen Parkinson-Patienten mit implantierten THS-Elektroden (Bild: Science Photo Library). (B) Schematische Darstellung der Lage der implantierten Komponenten eines THS-Systems, inklusive einer subkutan auf dem Brustmuskel lokalisierten Stimulationseinheit und dem subkutanen Kabel, dass die Impulse an die Elektroden im Zielgebiet weiterleitet (Bild: Medtronic Image Library). (C) Kinetra® Neurostimulator der Firma Medtronic zur Behandlung der motorischen Symptome bei Parkinson-Erkrankung, Dystonie und essentiellm Tremor (Bild: Medtronic Image Library). Neuere Entwicklungen sind z.B. das im Vergleich zu Kinetra® deutlich kleinere Activa® RC System von Medtronic (nicht abgebildet), das mit wieder aufladbarer Batterie und einer Lebensdauer von bis zu 9 Jahren beworben wird. (D) Vercise™ System der Firma Boston Scientific, ebenfalls zur Therapie der Parkinson-Erkrankung, Dystonie und essentiellm Tremor (Bild: www.bostonscientific-international.com).

1.6.2.1. Spannungs-kontrollierte vs. Strom-kontrollierte Stimulation

Bis in die jüngste Vergangenheit wurden für die THS-Therapie beim Menschen hauptsächlich Spannungs-kontrollierte Stimulationssysteme eingesetzt mit dem Nachteil, dass die Menge an Strom, die dem Gewebe bereitgestellt wird, nach dem ohmschen Gesetz ($I = \Delta V/R$) abhängig von der Elektroden- und Gewebeimpedanz ist. Im Tiermodell – wie auch in der vorliegenden Arbeit – wird vorwiegend mit Strom-kontrollierten Systemen gearbeitet. Der Vorteil im Vergleich zur Spannungs-kontrollierten Stimulation besteht in der Möglichkeit eine definierte elektrische Feldstärke im Gewebe zu erzeugen und somit zeitliche Änderungen der Übergangsimpedanz zwischen Elektrode und Gewebe zu kompensieren.

Jüngste Studien bestätigen, dass sich die Vorteile Strom-kontrollierter Stimulation auf bessere Therapieerfolge auswirkt (Cheung und Tagliati 2010, Okun *et al.* 2012, Gross und McDougal 2013, Lettieri *et al.* 2014).

1.6.3. Was bewirkt die Tiefe Hirnstimulation

Trotz ihrer klinisch bestätigten Wirksamkeit, beispielsweise bei der Behandlung von Zielsymptomen, sind die grundlegenden Mechanismen der THS noch nicht vollständig aufgeklärt. Zu den Grundprinzipien werden verschiedene Theorien diskutiert (modifiziert nach Gerlach *et al.* [2007]):

- „*Desynchronisation*“: Veränderung von Netzwerkeigenschaften: Die hochfrequente periodische Anregung des STN bewirkt, dass die pathologische (synchrone) oszillatorische Aktivität chaotisch gestört wird [Wilson *et al.* 2011].
- „*Depolarisationsblock*“: THS-induzierte Blockade spannungsabhängiger Ionenkanäle an Nervenzellmembranen im Wirkkreis der Stimulationselektrode [Beurrier *et al.* 2001].
- „*GABAerge Hemmung*“: Synaptisch-vermittelte Hemmung der Neurone im stimulierten Kerngebiet durch antidrome (gegen die physiologische Verlaufsrichtung) Erregung hemmender Afferenzen und Freisetzung von GABA [Dostrovsky *et al.* 2000].
- „*Synaptische Depression*“: Orthodrome (in physiologischer Verlaufsrichtung) Reizung efferenter Axone und Hemmung der synaptischen Übertragung im Projektionskern durch Erschöpfung des Neurotransmitterpools [Brock *et al.* 1952, Zucker und Regehr 2002].
- „*Jamming*“: Maskierung krankhaft veränderter Nervenzellaktivität durch unphysiologische Hochfrequenzsignale [Montgomery und Baker 2000].

1.6.4. Tiefe Hirnstimulation als Therapie bei der Parkinson-Erkrankung

Die Zielgebiete bei der Parkinson-Erkrankung sind der CM-Pf Komplex des Thalamus, sowie der STN und der GPi in den Basalganglien. Der GPi gehörte zu den ersten Hirnstrukturen überhaupt, die zur Behandlung von Bewegungsstörungen (mittels chirurgischer Läsion) herangezogen wurden. Nicht zuletzt aus diesem Grund wurde der GPi auch zuerst für die THS-Therapie in Betracht gezogen. Die Behandlung erfolgte erstmalig durch Siegfried und Lippitz [1994]. In den Folgejahren zeigte sich der STN ebenfalls als ein geeigneter Zielkern. Bisher durchgeführte Studien zum Vergleich der beiden Kerne

[Burchiel *et al.* 1999] zeigen geringfügig günstigere Resultate für den STN. Die Stimulation des thalamischen CM-Pf Komplexes ist dahingegen weitestgehend in den Hintergrund geraten, da durch dessen Stimulation die Kardinalssymptome Rigor und Hypokinese nicht beeinflusst werden [Gerlach *et al.* 2007].

Abb. 5 zeigt am Beispiel der STN-THS modellhaft den Mechanismus der Gegenregulation gegen die verminderte Thalamus-Aktivität unter Parkinson-Bedingungen. Die THS führt zu einer Hemmung der überaktiven STN-Aktivität. Diese Überaktivität ist Folge des striatalen Dopaminmangels und des dadurch ausgelösten Ungleichgewichtes im Regelkreis der Basalganglien. Die THS führt somit zur Steigerung der PPTN-Aktivität und damit zu einer Wiederherstellung des Gleichgewichtes zwischen hemmenden und erregenden Neurotransmittern.

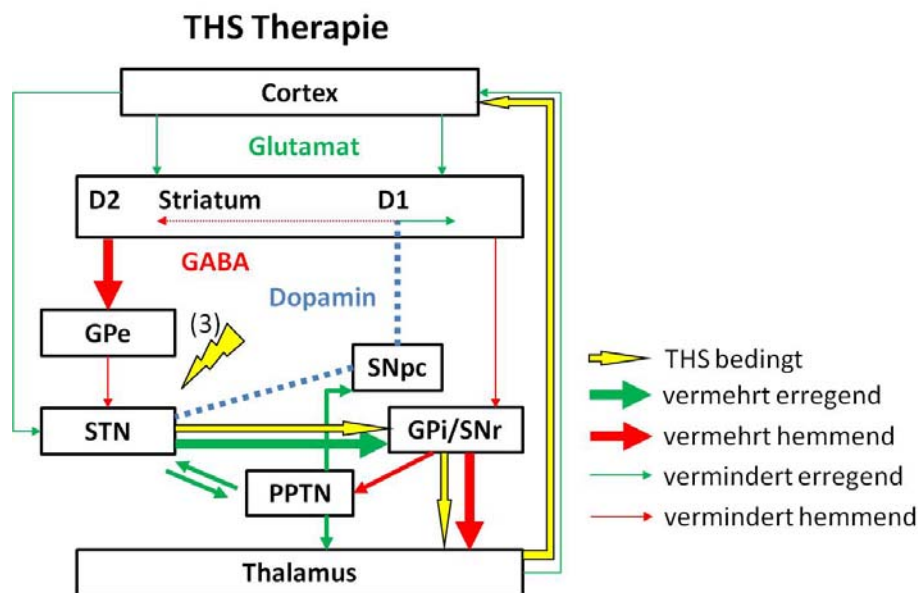


Abb. 5: Schematische Darstellung der Vernetzung der Basalganglien: THS-Therapie

Modifiziert nach Alexander *et al.* [1990], van Delden [2009] und Nambu *et al.* [2000]: Das bei der Parkinson-Erkrankung durch den striatalen Dopamin-Mangel hervorgerufene Ungleichgewicht zwischen hemmenden und erregenden Neurotransmittern führt zu einer Verstärkung des „indirekten Weges“, indem die Hemmung des GPe gesteigert wird. Dadurch ist der GPe nicht mehr in der Lage die Aktivität der subthalamischen Zellen zu begrenzen und es kommt zu einer Überaktivität des STN. Vgl. Abb. 1 (Normalzustand) und Abb. 2 (Zustand bei der Parkinson-Erkrankung). Die THS-Therapie bietet eine Möglichkeit der Gegenregulation gegen die verminderte Thalamus-Aktivität, und zwar die THS-vermittelte Hemmung der überaktiven STN-Aktivität und somit Steigerung der PPTN-Aktivität.

1.6.4.1. Auswahlkriterien für die THS bei der Parkinson-Erkrankung

Eine wichtige und schwierige Aufgabe ist nach wie vor die Patientenselektion. Einen Leitfaden bietet das „Core Assessment Program for Surgical Interventional Therapies in PD“ kurz: CAPSIT-PD [Defer *et al.* 1999]. Grundlegend kommt eine THS-Therapie für Menschen in

Einleitung

Frage, die unter einer fortgeschrittenen Parkinson-Erkrankung leiden (Spätsyndrom), insbesondere wenn eine medikamentöse Behandlung nicht oder nur unzureichend zu einer Symptomkontrolle bzw. der motorischen Verfügbarkeit der Patienten führt. Dennoch, für jeden Patienten wird eine individuelle Entscheidung getroffen, bei der Nutzen und Risiken gegeneinander abgewogen werden. Tab. 4 gibt einen Überblick über Ein- und Ausschlusskriterien an ausgewählten operierenden Zentren.

Tab. 4: Ein- und Ausschlusskriterien für die THS zur Therapie der Parkinson-Krankheit

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none">• biologisches Alter < 75 Jahre• Diagnose: IPS• Krankheitsdauer > 5 Jahre• keine relevante Ko-Morbidität• Ansprechen der Symptomatik auf dopaminerge Medikation• unzureichende Symptomkontrolle unter Medikation, bzw. intolerable Nebenwirkungen der Medikation	<ul style="list-style-type: none">• biologisches Alter > 75 Jahre• Demenz• MRT: schwere Leukenzephalopathie• MRT: schwere Hirnatrophie• nicht Medikamenten-induzierte psychiatrische Auffälligkeiten• unzureichendes Ansprechen der Symptome auf dopaminerge Medikation• Begleiterkrankungen, die die Lebenserwartung einschränken• schwere zerebrale Makroangiopathie• Antikoagulanzen-Therapie• Immunsuppression• Pseudobulbärparalyse• fehlende Kooperationsfähigkeit

Zusammenfassung der Ein- und Ausschlusskriterien an den Kliniken: Paracelsus-Elena-Klinik Kassel; Klinik und Poliklinik für Neurologie, Spezialambulanz für Bewegungsstörungen und Tiefe Hirnstimulation in Rostock; sowie nach Gerlach *et al.* [2007].

1.6.4.2. Einfluss auf die Symptomatik

Bisherige Erkenntnisse gehen davon aus, dass durch die THS-Therapie keine Heilung möglich ist und sich lediglich Symptome lindern lassen. Experimentelle Arbeiten beschäftigen sich jedoch mit dem Nachweis neurotropher, bzw. neuroprotektiver Effekte [Maesawa *et al.* 2004, Spieles-Engemann *et al.* 2011] oder vermuten sogar Neurogenese durch die Einwirkung der Langzeitstimulation [Goc *et al.* 2014].

Nachweislich positiven Einfluss hat THS insbesondere auf die Kardinalsymptome Tremor, Hypokinese und Rigor. Aber auch Depressionen und Angstzustände im „Off“, d.h. Phasen, in denen das Antiparkinson-Medikament keine Wirkung zeigt, lassen sich mit THS therapieren. Zudem, mit der Reduktion der hochdosierten dopaminergen Therapie kann mit einer Minderung exogener Psychosen gerechnet werden. Ebenso Medikamenten-bedingte Hyperkinesien können so reduziert werden.

1.6.5. Geschichte und Stand der Technik zur experimentellen Tiefen Hirnstimulation

Die Entwicklung der Neurostimulation kann auf eine sehr lange Geschichte zurückblicken. Der amerikanische Arzt Roberts Bartholow wendete im Jahre 1874 erstmals elektrischen Strom auf die Dura mater einer Patientin an. Der britische Physiologe und Neurologe Sir Victor Horsley war ebenfalls ein Pionier der Hirnchirurgie und setzte zwischen 1884 und 1886 intraoperative elektrische Stimulationen zur Lokalisation von Epilepsieherden ein. 1939 führte Russell Meyers Operationen im Bereich der Basalganglien durch, nachdem der deutsche Pathologe Rolf Hassler die Degeneration der SNpc in Zusammenhang mit der Parkinson-Erkrankung bestätigen konnte. Die ersten stereotaktischen Operationen wurden 1947 von Ernst A. Spiegel und Henry T. Wycis vorgenommen. Nachdem die Stereotaxie aufgrund der Entdeckung von L-DOPA zunächst in den Hintergrund geraten war, erlebte die funktionelle Neurochirurgie mit Erfolgen im Bereich der THS rund 40 Jahre später eine Wiedergeburt. 1982 behandelte der Züricher Neurochirurg Jean Siegfried erstmals unwillkürliche Bewegungsstörungen mit der THS, 1986 behandelten Alim Louis Benabid und Pierre Pollak in Grenoble als erste den Tremor mit der THS [Benabid *et al.* 1987]. Die Zulassung der THS durch die FDA (Food and Drug Administration) für die Therapie des essentiellen Tremors erfolgte 1997, für die Parkinson-Erkrankung 2002. Die Therapie von Dystonie ist in Europa seit 2003 zugelassen, die Therapie von Epilepsie seit 2010.

Trotz der klinischen Erfolgsgeschichte sind die grundlegenden Mechanismen der THS bis heute nicht gänzlich verstanden und bedürfen weiterer Forschung – für welche sich die Arbeit am Tiermodell anbietet. Aus dem Blickwinkel einer modernen Medizinprodukte-Entwicklung verlief die Geschichte der THS höchst ungewöhnlich. Die Tatsache, dass „Experimente“ am Menschen vor systematischer experimenteller Forschung am Tiermodell stattfanden, wäre heutzutage undenkbar und ist dem Pionierdrang der Geschichte zuzuschreiben.

Die Entwicklung experimenteller Modelle zur Erforschung der THS ist weitaus umfangreicher als die oben beschriebene Entwicklung der Behandlungsmethode an sich. Dem aktuellen Stand der Literatur nach zu urteilen, wird in den meisten experimentellen Arbeiten mit Tiermodellen nur die kurzzeitige Wirkung der THS erforscht, in einigen Fällen nur in anästhesierten Tieren direkt nach der Elektrodenimplantation. In diesen Experimenten werden in der Regel externe Stimulationseinheiten eingesetzt und das Verhalten der Tiere unter Stimulation nicht untersucht. Einen hervorragenden Überblick

dazu geben die Übersichtsarbeiten von Gubellini *et al.* [2009] und Spieles-Engemann *et al.* [2010]. Um jedoch einen Vergleich mit der klinischen Situation zuzulassen, sind Verhaltenstests insbesondere im Langzeitversuch von besonderer Notwendigkeit. Die in dieser Arbeit vorgestellte chronische Instrumentierung zielt auf eine Verlängerung der Beobachtungszeiträume – eine Herausforderung, die bis heute nur wenige Forschergruppen wie Maesawa *et al.* [2004], Temel *et al.* [2006], Forni *et al.* [2012] und Ewing *et al.* [2013a, 2013b] angegangen sind. Im klassischen Ansatz werden die implantierten Elektroden mit stationären Stimulationseinheiten über Kabelbäume verbunden, was zwar die Bewegung der Tiere erlaubt, sie aber auf ein sehr eingeschränktes Feld begrenzt [Fang *et al.* 2006, So *et al.* 2012, Calleja-Castillo *et al.* 2013, Cooperrider *et al.* 2014]. Diese Einschränkung limitiert die Bandbreite möglicher Verhaltenstests. Diese Nachteile umgehend, implantierten Harnack *et al.* [2008] ein miniaturisiertes Gesamtsystem, um die Untersuchung des Verhaltens freilaufender Ratten zu ermöglichen. Im Vergleich zu der hier vorgestellten Methode allerdings mit wesentlich höherem operativen Trauma. In einem anderen innovativen Ansatz fixierten einige Arbeitsgruppen [Liu *et al.* 2008, Forni *et al.* 2012, Ewing *et al.* 2013a, 2013b] die ebenfalls stark miniaturisierten Stimulationseinheiten am Kopf der Tiere (in einem Aufsatz direkt über den implantierten Elektroden) und ermöglichten so die Durchführung von Langzeitexperimenten mit freilaufenden Tieren von bis zu 5 Wochen. In dieser Arbeit wird eine neue Methode der chronischen Instrumentierung vorgestellt, die Langzeitstudien an vollkommen frei beweglichen Tieren von bis zu 6 Wochen ermöglicht. Dieser Ansatz kombiniert eine miniaturisierte Stimulationseinheit inklusive Energieversorgung in einem textilen „Rucksack“ mit kundenspezifisch angefertigten THS-Elektroden, die über subkutan verlaufende Kabel miteinander verbunden sind.

1.7. Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob durch den Langzeiteinsatz von THS im 6-Hydroxydopamin-induzierten Hemiparkinsonmodell der Ratte vorteilhafte oder sogar persistierende Effekte nachweisbar werden und welche Rolle unterschiedliche Geometrien und Feldverteilungen der Elektroden bei möglichen THS-Wirkungen auf die Motorik und das Ängstlichkeitsverhalten der Tiere spielen.

Dazu musste im ersten Schritt das 6-Hydroxydopamin-induzierte Hemiparkinsonmodell der Ratte etabliert und eine chronische Instrumentierung entwickelt werden, die die THS in vollkommen freibeweglichen Ratten über einen Zeitraum von bis zu 6 Wochen erlaubte.

In dem Modell sollte dann eine vergleichende Studie mit mindestens zwei Elektrodenmodifikationen durchgeführt werden. Läsions- und THS-bedingte Effekte sollten mit geeigneten Verhaltenstests quantifiziert werden, wobei aussagekräftige Parameter bestimmt und miteinander verglichen werden mussten. In einer begleitenden Studie sollte das Einwachsverhalten der Elektroden mittels EIS charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Eine Zusammenstellung aller verwendeten Reagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien können den Tabellen im Anhang 1 und 2 entnommen werden.

2.2. Tiere und Haltungsbedingungen

Für die Durchführung der Tierversuche wurden männliche Ratten des Stammes Wistar Han der Versuchstierlinie Crl:WI(Han) (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Läsionseingriffe wurden bei Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 300 g vorgenommen.

Die Ratten wurden in einem 12 h Tag/Nacht-Zyklus unter klimatisierten Bedingungen ($22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, 40 % rel. Luftfeuchte) gehalten und erhielten ein spezielles pelletiertes Alleinfuttermittel (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) sowie angesäuertes Wasser, dessen sie sich *ad-libitum* bedienen konnten. Die Käfige wurden wöchentlich gereinigt. Bevor die Operationen stattfanden, wurden die Tiere paarweise in Käfigen gehalten, nach den Eingriffen wurden sie aus Sicherheitsgründen vereinzelt. Haltung und Tierversuche fanden in Übereinstimmung mit der EU-Tierversuchsrichtlinie 86/609/EWG zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere statt. Überprüft wurde dies in regelmäßigen Abständen von der örtlichen Tierschutzbehörde des Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (Az: LALLF M-V/TSEM/7221.3-1.2-019/10).

2.3. Versuchsplanung

2.3.1. Einteilung der Versuchsgruppen

Die **1. Versuchsphase** umfasste die Untersuchung von THS-Effekten bipolarer Elektroden auf 6-OHDA läionierte Ratten. Erfolgreich läionierte Ratten (≥ 2 Umdrehungen pro Minute im Apomorphin-induzierten Rotationstest) wurden in drei Testgruppen mit annähernd gleichem arithmetischen Mittelwert (in Bezug auf die pathologischen Umdrehungen) zu je $n = 7$ aufgeteilt und einer Implantations-OP unter Verwendung bipolarer Elektroden unterzogen. Es erfolgte die Aufteilung in die folgenden Testgruppen: Schein-THS („6-OHDA_sham_3d/3w“), Kurzzeit-THS für 3 Tage („6-OHDA_bi_3d“) und Langzeit-THS für 3 Wochen („6-OHDA_bi_3w“) (Tab. 5). Zehn gesunde Ratten ohne implantierte Elektrode

Material und Methoden

wurden als Kontrollgruppe („Naive_3d/3w“) mitgeführt. Aufgrund der Ausfälle zweier Elektroden im Langzeittest reduzierte sich die Gruppe „6-OHDA_bi_3w“ auf n = 5.

In der **2. Versuchsphase** wurden dann die THS-Effekte von unipolaren Elektroden auf 6-OHDA läionierte Tiere untersucht. In Analogie zur 1. Versuchsphase wurden erfolgreich läionierte Ratten wieder in eine 3-Tages- („6-OHDA_uni_3d“) und eine 3-Wochengruppe („6-OHDA_uni_3w/3w+3d off“) (Tab. 5) zu je n = 13 aufgeteilt. Anschließend erfolgte die Implantation unipolarer Elektroden. Auf eine zusätzliche Schein-THS-Gruppe unter Verwendung unipolarer Elektroden konnte verzichtet werden, da diese der bipolaren Schein-THS-Behandlung entspricht. Auch hier reduzierte sich die Gruppengröße der Langzeit-THS-behandelten Ratten von anfangs n = 13 auf n = 11 zum Zeitpunkt des finalen Apomorphin-induzierten Rotationstests.

Mit der **3. Versuchsphase** sollten schließlich Auswirkungen von THS, bzw. Schein-THS auf gesunde und Schein-läionierte Ratten näher untersucht werden. Hierbei wurden einer Testgruppe („Naive_sham_3w“) von n = 10 gesunden Ratten ohne 6-OHDA-Läsionierung bipolare Elektroden implantiert und diese über einen Zeitraum von 3 Wochen Schein-THS-behandelt. Schein-läionierte Ratten (Läsion mit Zitratpuffer) wurden einer Implantation bipolarer Elektroden unterzogen, in 2 Testgruppen zu je n = 10 aufgeteilt und anschließend über einen Zeitraum von 3 Tagen („Sham_bi_3d“) und 3 Wochen („Sham_bi_3w“) THS-behandelt.

In der finalen, **4. Versuchsphase** wurde das Testprogramm mit der effektiveren Elektrodenart über einen verlängerten Untersuchungszeitraum wiederholt. Erfolgreich läionierte Ratten wurden wie gehabt in 2 Testgruppen zu n = 8 aufgeteilt. Implantiert wurden die unipolaren Elektroden, die sich im Vergleich der ersten beiden Versuchsphasen als wirkungsvoller erwiesen. Eine Testgruppe („6-OHDA_uni_6w“) wurde dabei über einen Zeitraum von 6 Wochen einer kontinuierlichen Stimulation ausgesetzt. Mit der parallel untersuchten Testgruppe „6-OHDA_uni_3w+3w off“ sollte der sich andeutende persistierende Effekt, der in Auswertung der Ergebnisse der 3-Wochen-Gruppen auffiel, näher untersucht werden.

Hierzu wurden die Stimulatoren bei Testgruppe „6-OHDA_uni_3w+3w off“ nach einem Zeitraum von 3 Wochen abgeschaltet und das Versuchsprogramm unter Schein-THS weitere 3 Wochen fortgeführt. Eine Schein-läionierte Gruppe von n = 7 („Sham_uni_6w“) erhielt

Material und Methoden

ebenfalls unipolare Elektroden und wurde wie Testgruppe „6-OHDA_uni_6w“ einer kontinuierlichen 6-wöchigen THS ausgesetzt.

Um einen potentiell persistierenden Effekt zu prüfen, wurden die finalen Verhaltenstests der Langzeit-Gruppen „6-OHDA_uni_3w/3w+3d off“, „6-OHDA_bi_3w“ und „Sham_bi_3w“ (3 Wochen THS, Testbeginn 1 Tag nach Abschaltung), sowie „6-OHDA_uni_3w+3w off“ (3 Wochen THS, Testbeginn 3 Wochen nach Abschaltung) erst nach Beendigung von THS durchgeführt. Die Durchführung der finalen Verhaltenstests bei den Kurzzeitgruppen: „6-OHDA_uni_3d“, „6-OHDA_bi_3d“, sowie „Sham_bi_3d“ bei den kontinuierlich stimulierten Langzeitgruppen der 4. Versuchsphase „6-OHDA_uni_6w“ und „Sham_uni_6w“ fand unter aktiver THS statt.

Tab. 5: Übersicht zur Einteilung der Versuchsgruppen

Gruppe	6-OHDA	Elektrode	Anzahl Ratten	Dauer THS bzw. Schein-THS	Entnahme Hirn und Histologie
Naive_3d/3w	-	-	10	-	3 Wochen
Naive_sham_3w	-	Bipolar	9	-	3 Wochen
6-OHDA_sham_3d/3w	+	Bipolar	7	-	3 Wochen
Sham_bi_3d	Schein	Bipolar	9	3 Tage	3 Tage
Sham_bi_3w	Schein	Bipolar	10	3 Wochen	3 Wochen
Sham_uni_6w	Schein	Unipolar	7	6 Wochen	6 Wochen
6-OHDA_bi_3d	+	Bipolar	7	3 Tage	3 Tage
6-OHDA_bi_3w	+	Bipolar	5	3 Wochen	3 Wochen
6-OHDA_uni_3d	+	Unipolar	13	3 Tage	3 Tage
6-OHDA_uni_3w/3w+3d off	+	Unipolar	11	3 Wochen	3 Wochen
6-OHDA_uni_6w	+	Unipolar	7	6 Wochen	6 Wochen
6-OHDA_uni_3w+3w off	+	Unipolar	8	3 Wochen THS und 3 Wochen Schein-THS	6 Wochen

Vergleichende Studie uni- und bipolarer Elektroden im 6-OHDA-Modell der Ratte. Bei Schein-stimulierten Tieren wurden ausschließlich bipolare Elektroden implantiert. Die Gruppengröße bezieht sich auf die Anzahl der Tiere zum Zeitpunkt des finalen Apomorphin-induzierten Rotationstests.

2.3.2. Zeit- und Ablaufplan

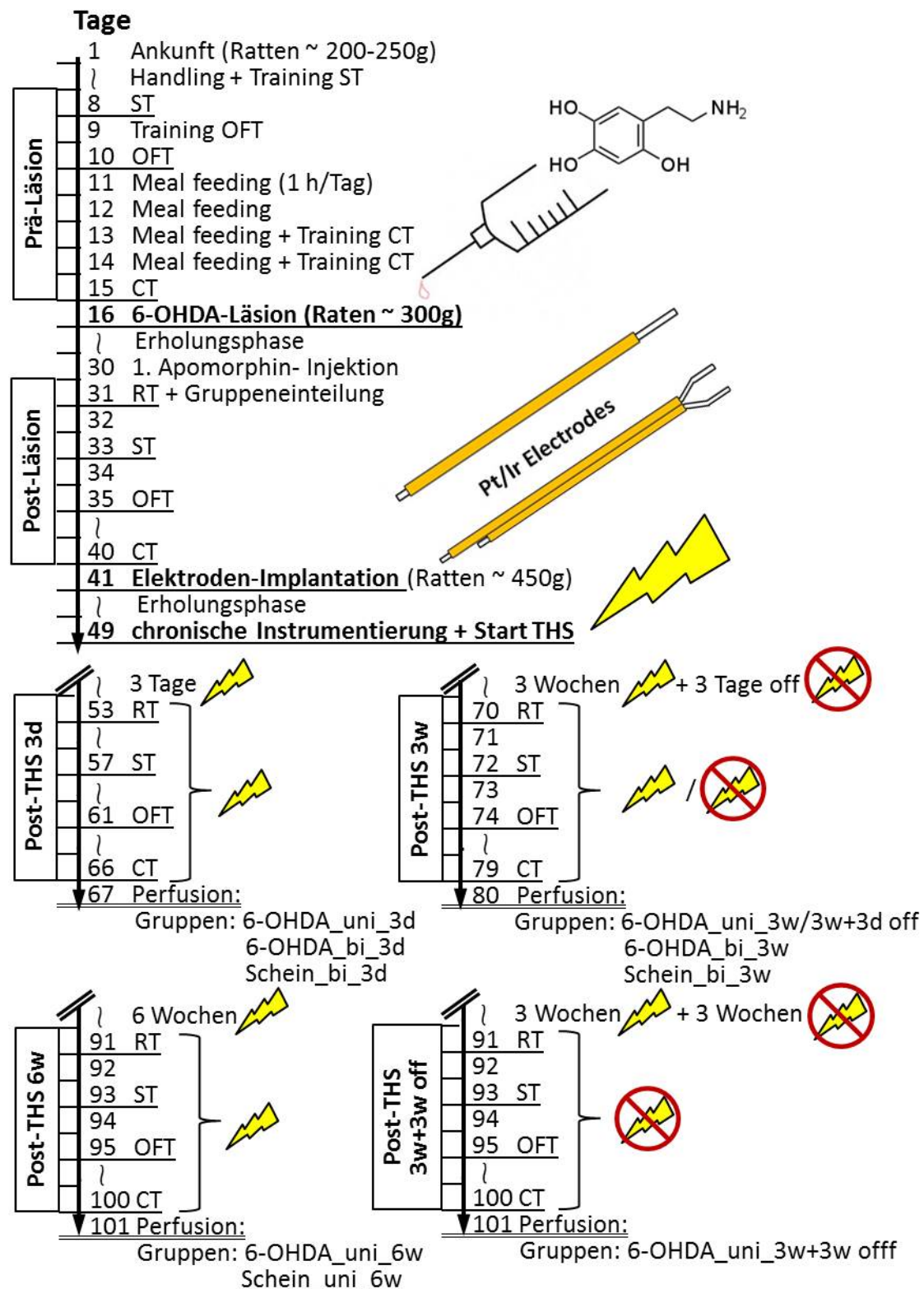


Abb. 6: Inhaltliche und zeitliche Darstellung des Versuchsablaufs.

RT, ST, OFT und CT stehen für Rotationstest, Stepping- Test, Offenfeld-Test und Korridor-Test.

2.4. Anästhesie

Eine Narkose der Ratten war für die Durchführung der stereotaktischen Operationen (6-OHDA-Läsion, Schein-Läsion und Implantation der THS-Elektroden), sowie für die EIS-Messung, die es erforderte, dass sich die Tiere mehrere Minuten in vollkommener Ruhe befanden, notwendig.

Für die stereotaktischen Operationen wurde ca. 10 min vor Operationsbeginn eine Mischung („Mousemix“) von 10 mg Ketamin-Hydrochlorid (Ketanest S[®] 25 mg/ml, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) und 0,5 mg Xylazin (Rompun[®] 20 mg/ml Injektionslösung für Tiere, 20 mg/ml, Bayer Austria, Wien) pro 100 g Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Mit dem invasiven Eingriff wurde erst nach Prüfung des Hinterpfotenreflexes⁹ zur Feststellung der Narkosetiefe (chirurgisches Toleranzstadium III₂ nach [Guedel 1951]) begonnen. Bei einzelnen Tieren war eine zusätzliche Injektion von einem Drittel der Initialdosis notwendig. Diese Dosis eignete sich auch für die kurzzeitige Betäubung (ca. 20 min) für die EIS-Messung. Die Initialdosis ermöglichte im Normalfall ein Operationsfenster von 45 bis 60 min.

Da der Lidreflex durch die Narkose aufgehoben wird, wurden die Augen der Ratten mit einem gelartigen Tränenersatzmittel vor Austrocknung geschützt (Vidisic[®], Bausch und Lomb GmbH, Berlin, Deutschland).

2.5. Vor- und Nachbereitung der stereotaktischen Operationen

Nach erfolgreicher Anästhesie wurden die Ratten auf der Schädeldecke und im mittleren Rückenbereich mithilfe eines elektrischen Tierhaarschneiders (Aesculap, Tübingen, Deutschland) rasiert und im stereotaktischen Rahmen (Stoelting CO. Wood Dale, Illinois, USA) in die sogenannte „flat-skull“ Position gebracht (Abb. 7). Mithilfe eines Skalpells erfolgte durch einen sagittalen Schnitt die Eröffnung der Kopfhaut und Freilegung der Suturen. Dazu musste das Periost sanft mit dem Skalpell beiseitegeschoben werden. Die Wunde wurde mit 4 geraden Dieffenbach-Gefäßklemmen (Größe 3,5 cm, Allgaier Instrumente, Frittlingen/Tuttlingen, Deutschland) offengehalten.

⁹ Zur Prüfung des Hinterpfoten-Reflexes wird fest zwischen die Zehen einer Hinterpfote gekniffen. Bei Reaktion (Anspannen der Muskulatur der Extremität) ist die Narkose noch nicht tief genug.

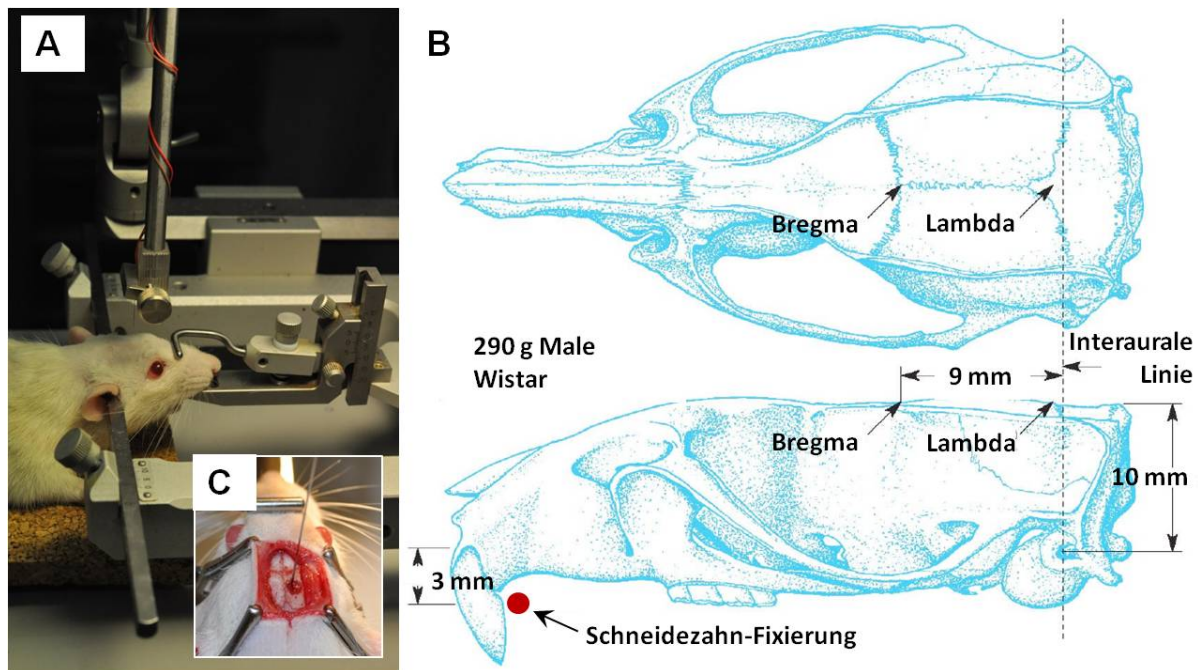


Abb. 7: Stereotaxie

(A) Narkotisierte Ratte in einem stereotaktischen Rahmen zur Durchführung chirurgischer Operationen, bei denen die Ansteuerung von Zielkoordinaten erforderlich ist. Die Ratte wird mittels Fixierungsvorrichtungen für die oberen Schneidezähne „tooth-bar“ und für beide Gehörgänge „ear-bars“ in die sogenannte „flat skull“ Position gebracht. (B) Dorsale und laterale Ansicht des Schädels einer 290 g schweren Ratte mit Darstellung der Knochennähte aus Paxinos und Watson [2007]. Die Kreuzung „Bregma“ wurde bei den stereotaktischen Operationen als Referenzpunkt genutzt. (C) Freigelegte Suturen bei einer narkotisierten Ratte mit Bohrung im Schädel über den Zielkoordinaten.

Nach dem chirurgischen Eingriff wurde die Wunde mit je drei Wundklammern nach Michel (Größe 7,5 x 1,75 mm) verschlossen. Die Ratten erhielten eine Injektion von 0,1 ml Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm®, 500mg/ml, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) direkt in das den Wundrand umgebende Gewebe, sowie eine subkutane Injektion von 4 ml physiologischer Kochsalzlösung subkutan in den Rückenbereich. Um Auskühlung zu verhindern, verweilten die Ratten bis zur Rückkehr vitaler Funktionen (Entleerung der Blase, Augenzwinkern, Bewegung der Gliedmaßen) mit abgedeckter Kopfpattie unter Rotlicht. Danach wurden sie einzeln in die Heimatkäfige zurückgesetzt und bekamen zur Kräftigung je eine Erdnuss (naturbelassen mit Schale) und ein Kästchen Schokolade der Marke „Zetti Schlager Süßtafel“ angeboten. Der Konsum der „Leckerli“ über Nacht wurde als Zeichen positiver Genesung gesehen. Tiere, die das außergewöhnliche Nahrungsangebot verschmähten, wurden unter besondere Beobachtung gestellt.

2.6. Unilaterale 6-OHDA-Läsion

Bei unilateraler Läsion des MVB lauteten die Zielkoordinaten relativ zum Bregma: anterior-posterior (AP) = -2,3 mm, medial-lateral (ML) = -1,5 mm und dorsal-ventral (DV) = -9 mm nach Paxinos und Watson [2007]. Nach Freilegung der Suturen wurde das Bregma mit der Spitze der eingespannten 5 µl Hamiltonspritze (Postnova Analytics, Landsberg/Lech, Deutschland) angepeilt und die Koordinaten an der Skala des Stereotaxie-Apparates abgelesen und protokolliert (Vorlage eines OP-Protokolls siehe Anhang 4). Die absoluten Zielkoordinaten in x/y-Richtung wurden berechnet, angesteuert und auf der Schädeldecke markiert. An dieser Stelle wurde mithilfe eines Dentalbohrers vorsichtig ein Loch durch die Schädeldecke bis zur äußeren Hirnhaut gebohrt. Diese wurde mit der Spitze einer scharfen Lanzette angeritzt und die Zielkoordinate in z-Richtung angesteuert. Über einen Zeitraum von 4 min erfolgte nun die Applikation von 4 µl einer 0,1-molaren Zitratpuffer-Lösung, die 24 µg 6-OHDA enthielt. Während des Operationszeitraums wurde die Injektionslösung dunkel in einer Styroporbox auf Eis gelagert.

Um den Erfolg der Läsion zu überprüfen wurde nach 12-14 Tagen der Apomorphin-induzierte Rotationstest (2.14.1) durchgeführt. Schein-läsionierte Tiere wurden exakt gleich behandelt, nur dass die 0,1-molare Zitratpuffer-Lösung kein 6-OHDA enthielt.

2.7. Stimulationselektroden

Zur Stimulation des STN wurden kundenspezifisch gefertigte uni- (Polyfil, Zug, Schweiz, Abb. 8) und bipolare (FHC, Bowdoin, ME, USA, Abb. 9) Pt/Ir-Elektroden (Pt90Ir10) entworfen, mit Kabeln und Stecken verbunden und Ratten implantiert. Beide Elektrodenarten waren von Herstellerseite aus mit einer Isolationsbeschichtung versehen, wobei bei beiden Modellen ein 100 µm langer Bereich an den Spitzen unisoliert blieb. Die unipolare Elektrode erforderte die zusätzliche Implantation einer Gegenelektrode. Hierfür wurde ein 30 mm langer und 0,2 mm dicker Golddraht (Goodfellow GmbH, Bad Nauheim, Deutschland) verwendet, der subkutan im Nackenbereich implantiert wurde (Abb. 15B, C). Bei den bipolaren Elektroden handelt es sich um parallel verschobene (offset 300 µm), biphasisch angesteuerte Doppelkontaktelektroden.

Die Elektroden wurden als 15 mm lange „Drahtstücken“ bezogen und mussten noch mit dem biokompatibel ummantelten Kabel kontaktiert werden. Da die Isolationsbeschichtung hitzeempfindlich ist, kam eine Lötverbindung nicht in Frage. Verwendet wurde deshalb ein

Material und Methoden

leitfähiger Epoxidklebstoff auf Silberbasis (RS 186-3616, RS Components GmbH, Mörfelden-Walldorf, Deutschland), der mittels einer dünnen Kanüle in ein 1 mm dickes, ca. 5 mm langes, transparentes, biokompatibles Schrumpfschlauchstück eingebracht wurde.

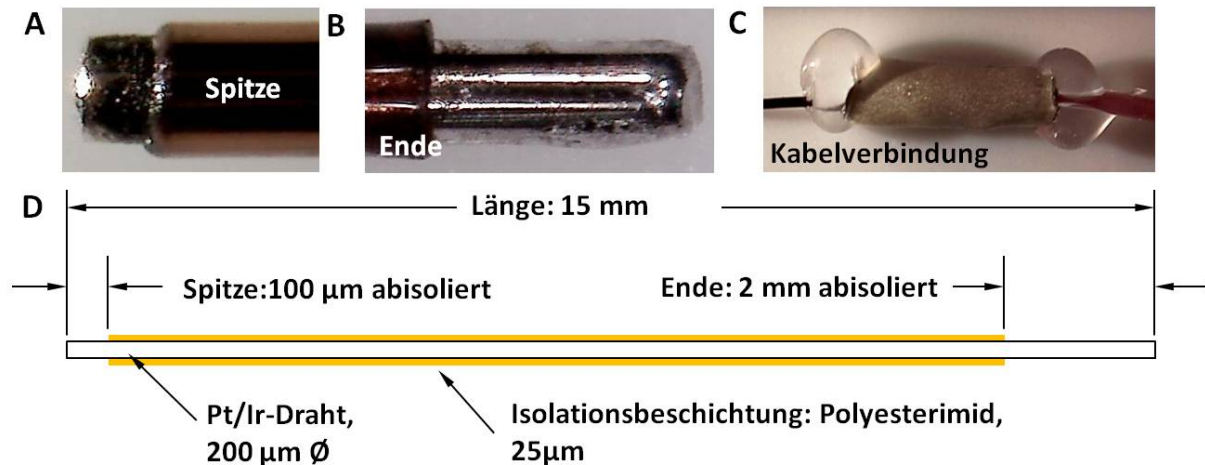


Abb. 8: Verwendete unipolare Elektroden

Fotos: (A) der Spitze (100 µm isolationsfrei) einer unipolaren 200 µm dicken Pt/Ir-THS-Elektrode (Polyfil, Zug, Schweiz), (B) des Endstücks und (C) der Verbindung des Endstücks mit dem Kabel. (D) Schematische Darstellung.

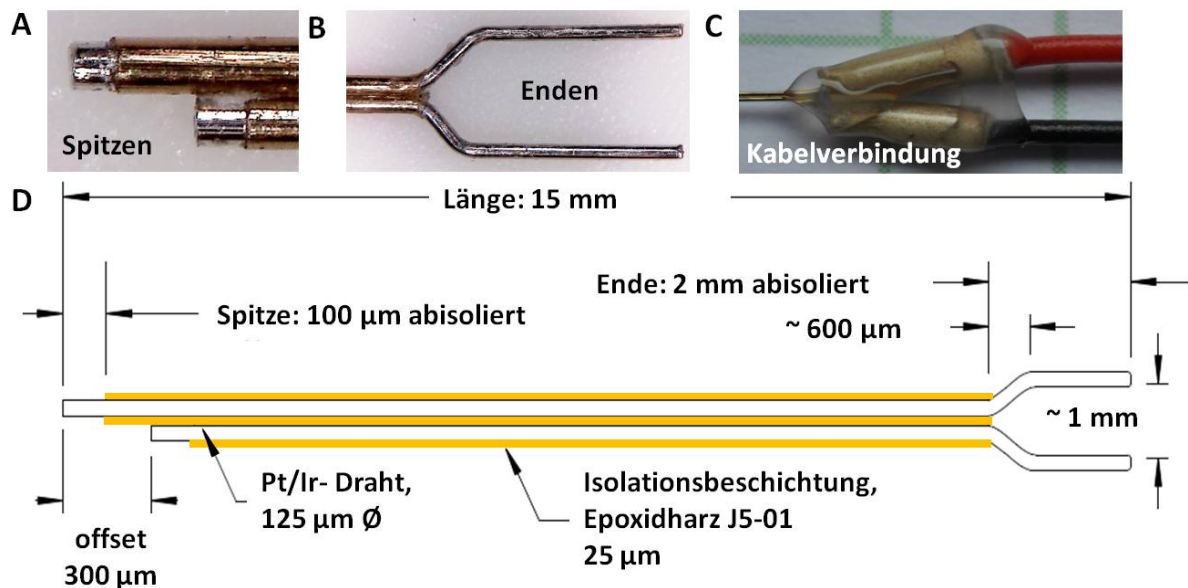


Abb. 9: Verwendete bipolare Elektroden

Fotos: (A) der Spitzen (Abisolierung 100 µm, Abstand der Spitzen 300 µm) einer bipolaren, insgesamt 250 µm dicken Pt/Ir-THS-Elektrode (FHC, Bowdoin, ME, USA), (B) des gabelförmig verzweigten Endstücks und (C) der Verbindung des Endstücks mit zwei Kabeln. (D) Schematische Darstellung.

Die einzelnen Verfahrensschritte zur Aufbau- und Verbindungstechnik der Kontaktierung der Elektroden mit den Kabeln ist unter Abb. 10 dargestellt und beschrieben.

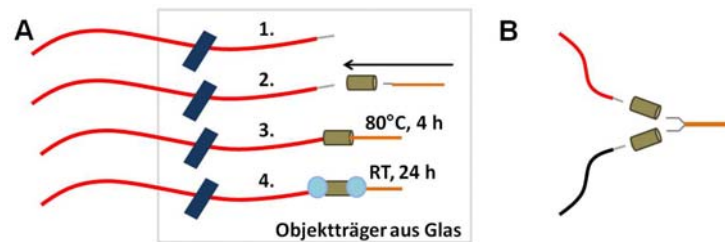


Abb. 10: Kabelkontaktierung der Elektroden

(A) Skizze zur Aufbau- und Verbindungstechnik der Elektroden in vier Schritten: (1) Abisolierung (ca. 2 mm) von ca. 15 cm langen Kabelabschnitten und Fixierung mittels Klebeband auf einem Glasobjektträger. (2) Beidseitiges Einführen der abisolierten Enden von Kabel und Elektrode in ein mit Leitkleber gefülltes biokompatibles und transparentes Schrumpfschlauchstück (ca. 2 mm). (3) Aushärtung des Leitklebers bei 80 °C über 4 h im Wärmeschrank. (4) Beidseitige Isolation mittels mit je eines Tropfens aus biokompatiblen Silikon (NuSil Technology, Carpinteria, USA) und Aushärtung bei Raumtemperatur über 24 h. (B) Bei den bipolaren Elektroden erfolgte die Aufbau- und Verbindungstechnik analog, nur dass hier 2 Kabel kontaktiert werden mussten.

2.8. Elektrodenimplantation

Die Koordinaten für die Implantation der THS-Elektroden in den STN der rechten Hemisphäre nach Paxinos und Watson [2007] waren: anterior-posterior (AP) = -3,8 mm, medial-lateral (ML) = -2,4 mm und dorsal-ventral (DV) = -7,6 mm (Abb. 11). Bei Ratten mit einem Körpergewicht über 350 g erfolgte eine Korrektur¹⁰ der Koordinaten. In diesem Fall lauteten die Zielkoordinaten wie folgt: AP_{>350g} = -4,0 mm und DV_{>350g} = -8,1 mm (die ML-Koordinate blieb unverändert).

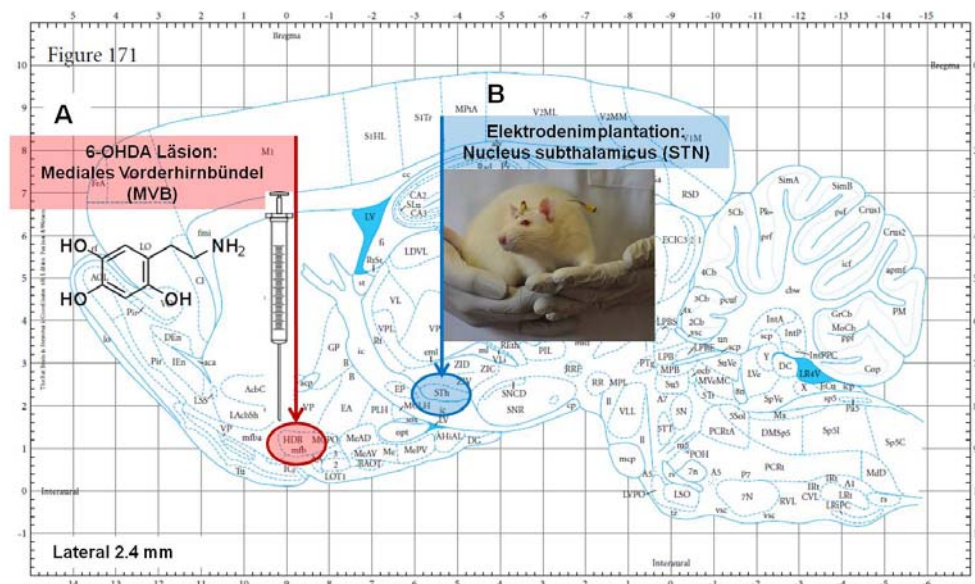


Abb. 11: Zielregionen für die stereotaktischen Operationen

Schema eines lateralen Hirnschnittes aus Paxinos und Watson [2007] mit den Zielregionen für: (A) 6-OHDA-induzierte Läsion und (B) Elektrodenimplantation.

¹⁰ Der Rattenhirnatlas nach Paxinos und Watson [2007] ist anwendbar auf Ratten mit einem Gewicht von 250-350 g.

In Analogie zur Läsionierungs-OP (Kap. 2.6) diente die Spitze einer eingespannten THS-Elektrode der Anpeilung der absoluten Zielkoordinaten in x/y-Richtung und der Markierung der Bohrungsstelle senkrecht über dem Zielgebiet. Es erfolgte die Durchbohrung des Schädels bis zur Dura mater und die Anritzung dieser mit einer Lanzette, um einer Verbiegung der Elektrode beim späteren Eindringen in das Gehirn vorzubeugen. Bevor die Elektrode eingeführt werden konnte, musste eine sogenannte „Ankerschraube“ (MailShop GmbH Augenoptik, Mühlacker, Deutschland) platziert werden (Abb. 12A). Dazu wurde auf der linken Hemisphäre ein kleines Loch vorgebohrt und die Ankerschraube mithilfe eines Schraubendrehers weniger als 1 mm tief in den Knochen des Schädels gedreht, sodass der Schraubenkopf überstand. Die vergoldete Ankerschraube (M 1,4; L 3,4 mm) diente der Fixierung der Elektrode am Schädel, indem sie den in einem späteren Schritt aufgetragenen, alles umhüllenden Klebstoffberg, stabilisierte. Mit der Ansteuerung der Zielkoordinate in z-Richtung wurde die Elektrode in das Hirn abgesenkt (Abb. 12B). Anschließend wurde ein schnell (ca. 30 s) aushärtender 2-Komponentenkleber (Luxatemp-Automix Plus, DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, Hamburg, Deutschland) auf Methacrylatbasis mittels einer dazugehörigen Mischpistole (M+V Dental, Bidingen, Deutschland) aufgetragen. Im ersten Schritt (Abb. 12C) gerade so viel, dass eine Schicht Kleber die freiliegende Schädeldecke bedeckte und die Elektrode sowie die Ankerschraube umhüllte, aber nicht die Klemmvorrichtung der Elektrode verschmutzte. Da der Kleber innerhalb von ca. 30 s aushärtete, war ein zügiges Verarbeiten erforderlich. Nach Aushärtung des Klebers wurde die Einmalmischkanüle der Mischpistole gewechselt, die Klemmvorrichtung des Elektrodenkabels vorsichtig gelöst und der z-Arm des Stereotaxierahmens beiseite gedreht. Das herausragende Kabel der Elektrode wurde mit den Fingern der linken Hand vorsichtig nach dorsal gebogen und gehalten, mit der Mischpistole wurde währenddessen eine zweite Kleberschicht über Elektrode und Ankerschraube aufgebracht (Abb. 12D). Nach Aushärtung des Klebers wurden „ear-bars“ und „tooth-bar“ vorsichtig gelöst und das Tier für die subkutane Kabelverlegung flach auf den Tisch gelegt. Dazu wurde zunächst ein kleiner Schnitt mit dem Skalpell an der gewünschten Austrittsöffnung am Rücken ausgeführt. Im nächsten Schritt wurde eine handelsübliche Stopfnadel der Größe 5/0 mit präpariertem Nadelöhr inklusive angelöteter Kabelschleife dazu genutzt, die Kabel unter der Rückenhaut durchzuziehen. Die Enden der Kabel wurden durch die Schleife geschoben und die Nadel mithilfe eines Nadelhalters subkutan ca. 5 cm unter der Rückenhaut entlang geschoben, bis

Material und Methoden

die Spitze die Austrittsöffnung erreichte. Der Nadelhalter übernahm nun die Spitze der Nadel an der Austrittsöffnung und zog den Rest nach. Abschließend wurde die Wunde geklammert, das Kabel mäanderförmig zu einem kleinen Knäul gelegt und mittels eines ca. 2 cm langen Schrumpfschlauches fixiert. Wichtig war, dass das Kabelknäul nicht herabhing, sondern relativ nah bei der Austrittsöffnung saß. Andernfalls waren die Tiere in der Lage den störenden Fremdkörper innerhalb kurzer Zeit zu entfernen. In den anschließenden sieben Tagen konnten sich die Tiere erholen.

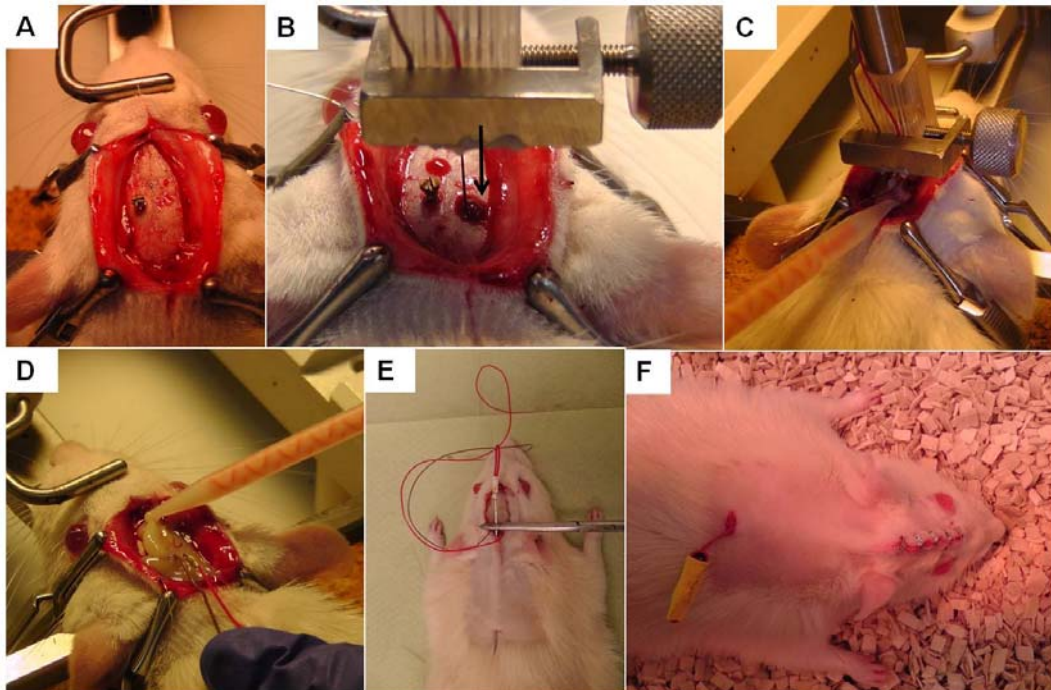


Abb. 12: Verlauf einer Elektrodenimplantations-OP

(A) Bestimmung der Zielkoordinaten in x/y-Richtung nach Freilegung des Bregmas und Implantation einer Ankerschraube in die Schädeldecke der gegenüberliegenden Hemisphäre. (B) Vorschub der Elektrodenspitze bis zur z-Koordinate (STN). (C) Auftrag einer ersten Kleberschicht, welche Ankerschraube und Elektrodenschaft an die Schädeldecke fixieren. (D) Biegung der Kabel nach dorsal und Auftrag einer zweiten Kleberschicht. (E) Verlegung der subkutanen Kabel. (F) Klammerung der Wunde und Fixierung der Kabel. Die Stabilität des Systems wird deutlich, wenn man betrachtet, dass die nach der Perfusion der Ratten entnommenen Explantate (Abb. 15C) teilweise mit einer Zange von der Schädeloberfläche gebrochen werden mussten.

2.9. Stimulatorplatinen und -parameter

THS erfolgte mit rechteckigen, monophasischen Konstantstrompulsen ($60 \mu\text{s}$, $200 \mu\text{A}$, kapazitiver Kompensationsstrom zwischen den Pulsen) bei einer Frequenz von 130 Hz, die von einer kundenspezifisch gefertigten Stimulatorplatine (Rückmann & Arndt, Berlin, Deutschland) generiert wurden. Die Einstellung der Stimulationsparameter erfolgte nach Komplettierung der Platinen mit Kabeln und Buchsen (Harwin Europe, UK) im Vorfeld der Experimente. Für den Abgleich der Parameter wurde die Platine über einen $10 \text{ k}\Omega$

Widerstand an ein Oszilloskop (Tektronix, Inc.) und an eine externe Strom- und Spannungsquelle angeschlossen (Abb. 13C). Über Drehwiderstände wurden die Parameter manuell eingestellt.

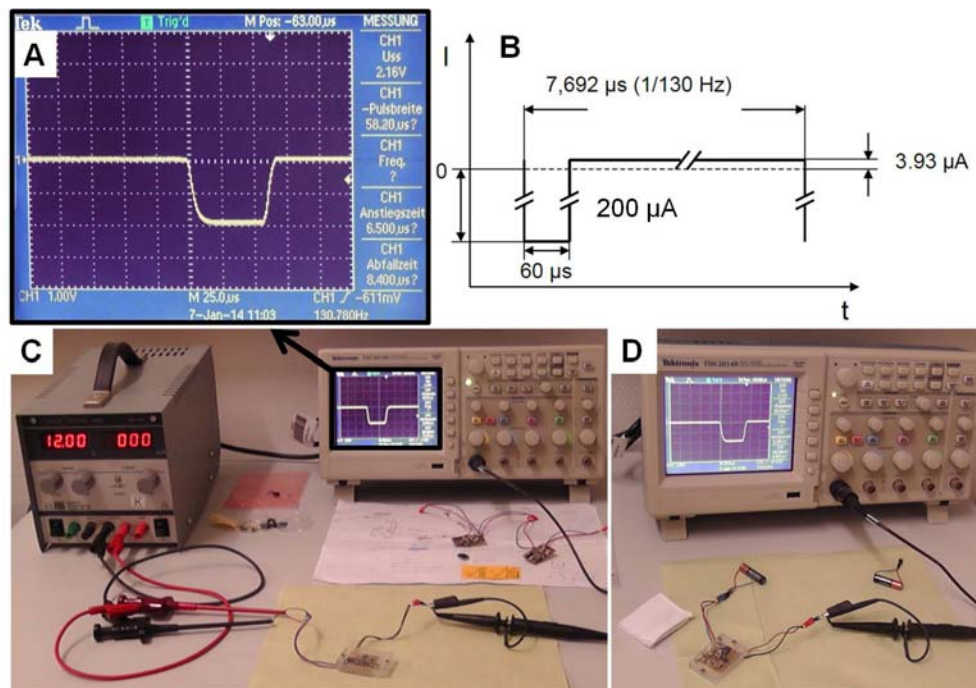


Abb. 13: Stimulationsparameter und Einstellung der Platinen

(A) Screenshot eines gemessenen und (B) Schema des negativen, monophasischen Konstantstromimpulses, der in dieser Arbeit für THS verwendet wurde. (C) Aufbau des Messplatzes zur Einstellung der Stimulatorplatinen unter Verwendung einer externen Strom- und Spannungsquelle und (D) Überprüfung der Funktionalität von Stimulatorplatine und Batterien.

2.10. Applikation der chronischen Instrumentierung

Eine Woche nach Implantation der Elektroden war die Wundheilung ausreichend vorangeschritten und die chronische Instrumentierung [Badstübner et al. 2013] der Ratten konnte beginnen. Lediglich für die erste¹¹ „Anprobe“ mussten die Tiere mit einem Drittel der Initialdosis an „Mousemix“ (Kap. 2.4) anästhesiert werden, da das subkutan verlegte Kabel noch mit einem Stecker komplettiert werden musste. Hierzu wurde das mäanderförmig aufgewickelte Kabelknäuel im Schrumpfschlauchstück (Abb. 12F) vorsichtig mit einem Skalpell aufgeschnitten und entwirrt. Ein 5-poliger Stecker (Harwin Europe, UK) wurde mit einem Seitenschneider auf 3 Pole getrimmt und mittels Crimphülsen und -zange mit den abisolierten Kabelenden des aus dem Rücken herausragenden subkutan verlegten Kabels elektrisch kontaktiert, sowie mit 3 Lagen unterschiedlich großer Schrumpfschläuche elektrisch isoliert und vor Feuchtigkeit geschützt (Abb. 14).

¹¹ Für das wöchentliche Wechseln der Weste war keine Betäubung notwendig.

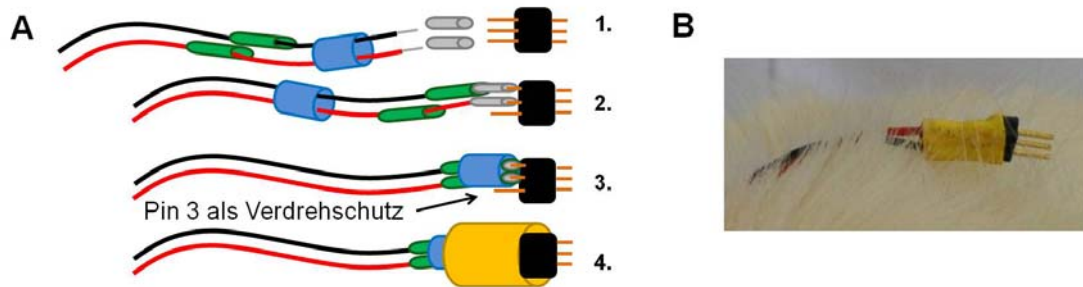


Abb. 14: Kontaktierung des Steckers an der Ratte

(A) Skizze zur Aufbau- und Verbindungstechnik des Steckers in 4 Schritten: (1) Elektrische Kontaktierung der Kabel von THS- und Gegenelektrode mit 2 Polen des Steckers mittels Crimphülsen. (2) bis (4) Isolation mit drei verschiedenen Schrumpfschlauchstücken aufsteigenden Durchmessers. Pin 3 des Steckers diente als visueller „Verdrehschutz“. (B) Foto des komplettierten Steckers an der Ratte.

Nach Komplettierung der Kabel mit einem Stecker wurde der textile Teil der chronischen Instrumentierung angelegt (Abb. 15E, D). Das kommerziell beziehbare Funktionstextil (Lomir Biomedical Inc., Vertrieb durch Föhr Medical Instruments (FMI) GmbH, Seeheim, Deutschland) besteht aus einer „Weste“, die in unterschiedlichen Größen¹² erhältlich ist und die mittels Klettverschluss mit dem kundenspezifisch angefertigten „Rucksack“ verbunden und dadurch gleichzeitig verschlossen wurde. Der Rucksack integriert den elektronischen Teil der chronischen Instrumentierung bestehend aus:

- einer miniaturisierten Stimulatorplatine, an die zusätzlich Kabel und 2 Buchsen angelötet wurden (Abb. 15E);
- einem kundenspezifisch angefertigten PMMA Gehäuse (Forschungswerkstatt der Universitätsmedizin Rostock), in das die Stimulatorplatine eingelegt wurde, um sie vor mechanischen Beanspruchungen und Spritzwasser zu schützen und
- der Energieversorgung, die von zwei verschiedenen Batterien (12 V und 3 V) bereitgestellt wurde (Abb. 15E, F).

Die 12 V Batterie wurde mit Kabeln und Stecker verlötet. Durch die Steckverbindung mit dem Buchsenkabel der Stimulatorplatine wurde die THS gestartet. Die 3 V Knopfzellen wurden durch speziell dafür angebrachte Halterungen auf der Rückseite der Stimulatorplatinen integriert (Abb. 15F). Die Energieversorgung wurde wöchentlich gewechselt. Ab Testperiode 4 kam eine verbesserte Variante der Stimulatorplatine zum Einsatz, so dass nur noch alle 30 Tage gewechselt werden musste.

¹² Größen: XS, S, M, L und XL. Im Rahmen der Arbeit wurde die Größe M für Tiergewichte von 250 bis 350 g verwendet.

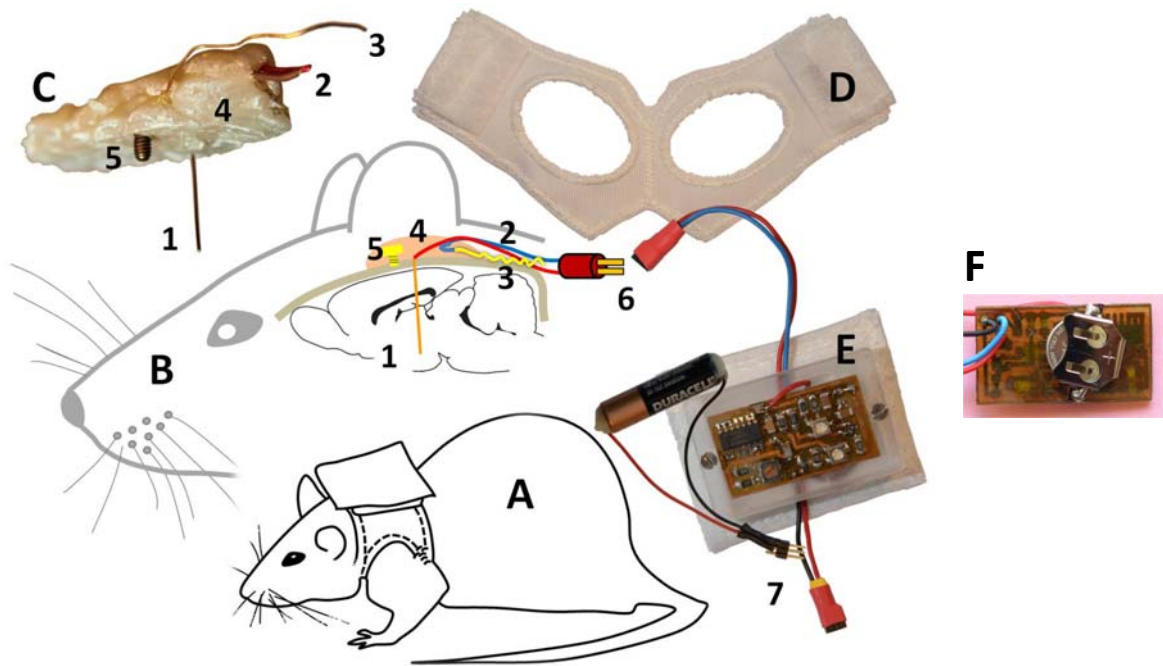


Abb. 15: Chronische Instrumentierung am Beispiel unipolarer THS

(A) Skizze einer freibeweglichen Ratte mit vollständiger chronischer Instrumentierung. (B) Skizze einer sagittalen Schnittansicht, die den implantationsseitigen Teil der chronischen Instrumentierung am Beispiel unipolarer THS veranschaulicht. (C) Foto eines explantierten THS-Aufbaus. (D) zeigt den textilen Teil, der sich aus einer kommerziell beziehbaren „Weste“ und einem „Rucksack“ zusammensetzt, die mittels Klettverschluss verbunden und gleichzeitig verschlossen wurden. Der Rucksack integrierte den unter (E) gezeigten elektronischen Teil der chronischen Instrumentierung bestehend aus der eingehäuteten Stimulatorplatine mit Kabeln, Buchsen und zwei unterschiedlichen Batterien. (F) Rückansicht der Stimulatorplatine. 1: unipolare Pt/Ir-Elektrode; 2: Kabel von Elektrode und Gegenelektrode; 3: Gegenelektrode aus Golddraht; 4: biokompatibles, handelsübliches Kronen- und Brückenmaterial aus der Zahnheilkunde, das alle Komponenten umhüllte; 5: vergoldete Ankerschraube, die den Aufbau an den Schädel fixierte; 7: Steckverbindung Batterie.

Weste und Rucksack mussten mindestens einmal pro Woche wegen Abnutzungserscheinungen ausgetauscht werden. Während der wöchentlichen Wechselprozedur wurde parallel die Funktionalität des implantierten Systems mittels EIS überprüft. Die Überprüfung der Funktionalität der Stimulatoren und Batterien erfolgte mit dem Oszilloskop (Abb. 13D).

2.11. Elektrische Impedanz Spektroskopie

Für die Studie des Einwachsverhaltens der Elektroden wurden andere Tiere verwendet als für die Verhaltenstests. Die Versuchsbedingungen können Tab. 6 entnommen werden. Den Ratten wurde entweder eine unipolare Elektrode in Kombination mit einer subkutanen Gegenelektrode aus Golddraht (Abb. 8) oder eine bipolare Elektrode mit parallel geführten Spitzen (Abb. 9) implantiert. Für beide Elektrodentypen wurden die gleichen Stimulatorplatten (Abb. 15C) verwendet. EIS-Messungen wurden täglich für jeweils ca.

Material und Methoden

12 min durchgeführt. Für die Messungen wurden die Ratten anästhesiert (Kap. 2.4). EIS-*in-vivo*-Messungen wurden bis zu 6 Wochen durchgeführt.

Tab. 6: Versuchsbedingungen: EIS-*in-vivo*-Messungen

Testparameter	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Exp. IV
THS-Elektrode	Unipolar	Unipolar	Bipolar	Unipolar
Gegenelektrode (GE)	Zahnsparngendraht	Anordnung von Wundklammern	eine der beiden Spitzen	Golddraht
Lage der GE	Subkutan	Subkutan	Intrazerebral	Subkutan
Messzeitraum (<i>in-vivo</i>)	12 Tage	bis zu 22 Tagen	bis zu 14 Tagen	bis zu 36 Tagen
Ziel des Experimentes	Vorversuch: Test der Messmethode	Vorversuch: Einfluss der Position der Gegenelektrode	Einwachsverhalten bipolarer Elektroden	Einwachsverhalten unipolarer Elektroden
Gruppengröße	1	6	4	9
Stimulatorplatinen und Stimulationssignal	Rechteckige, negative Konstantstromimpulse (60 μ s, 200 μ A) bei einer Frequenz von 130 Hz			

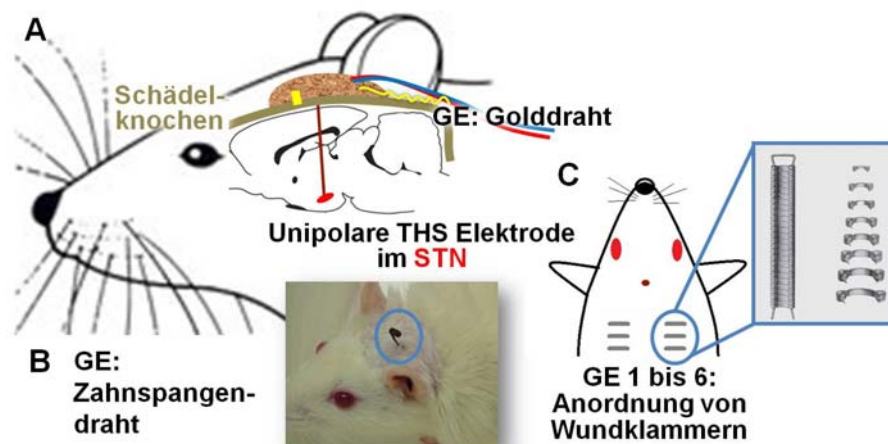


Abb. 16: EIS-Messungen: verwendete Gegenelektroden

Unterschiedliche Gegenelektroden, die in Kombination mit den unipolaren THS-Elektroden verwendet wurden: (A) Schematische Darstellung der Implantationskomponenten unter Verwendung einer Gegenelektrode aus Golddraht, (B) Foto einer Ratte mit Gegenelektrode aus biokompatiblen, nickel-freien Zahnsparngendraht aus Edelstahl und (C) Schema zur Darstellung der Anordnung von Wundklammern, die jeweils einzeln als Gegenelektrode genutzt wurden.

Die Experimente wurden mit dem Impedanzspektrometer Sciospec ISX3 (Sciospec Scientific Instruments, Pausitz, Deutschland) und der dazugehörigen Sciospec-Software für PC-basierte Steuerung durchgeführt (Abb. 17).

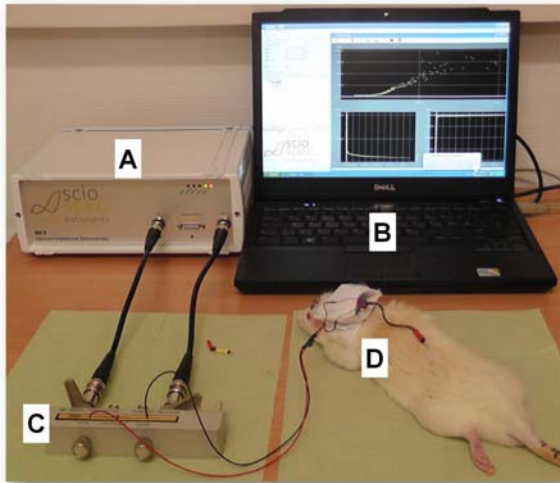


Abb. 17: Messplatz für EIS-*in-vivo*-Messung

Messanordnung für tägliche EIS-*in-vivo*-Messungen implantierter Elektroden in anästhesierten Ratten (D) bestehend aus:

(A) Impedanzspektrometer Sciospec ISX3 (Sciospec Scientific Instruments, Pausitz, Deutschland);

(B) Benutzeroberfläche der Sciospec-Software für PC-basierte Steuerung und

(C) Aufspannvorrichtung HP16047D (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Deutschland).

Mithilfe der Aufspannvorrichtung HP16047D (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Deutschland) wurden die Signale der subkutanen Kabel von THS- und Gegenelektrode abgeleitet. Die Real- und Imaginärteile der Elektrodenimpedanzen wurden im Frequenzspektrum von 100 Hz bis 10 MHz aufgezeichnet. Die Messspannung betrug 12,5 mV_{pp}. Die über fünf Messzyklen gemittelten Werte (insgesamt 401 Messpunkte) wurden an die Sciospec-Software übertragen und über einer logarithmischen Frequenzskala aufgetragen. Vor jeder Messung wurde eine Kalibrierung mittels Offen-, Kurzschluss- und Lastmessung (10 kΩ) vorgenommen. Jede Messung wurde dreimal wiederholt und das arithmetische Mittel als Datenpunkt abgespeichert. Parallel zur Datenverarbeitung in Microsoft Office Excel 2007 (die hier präsentiert werden) wurden die Daten auch nach Matlab (The MathWorks™, Version 7.9.0.529) transferiert, wo sie in Kooperation mit Dipl.-Ing. Thomas Kröger¹³ insbesondere in Hinblick auf die Veröffentlichung in Badstübner und Kröger *et. al* [2016] (in Vorbereitung) aufbereitet wurden.

Die Impedanz wurde in einem relativ breiten Frequenzspektrum von 100 Hz bis 10 MHz gemessen. Die Gründe dafür sind: (i) der für die Stimulation der Tiere verwendete monophasische Rechteckimpuls ist reich an harmonischen Funktionen (Oberschwingungsfrequenzen) [Grill und Mortimer 1994, Gimsa *et al.* 2005], sodass besonders für die Modellierung der steilen Flanken höhere Frequenzen erforderlich sind und (ii) um die Resistivitäten zu extrahieren, werden die vollen Spektren benötigt.

¹³ Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Lehrstuhl für Biophysik, Universität Rostock.

2.12. Elektrodenimpedanz: Äquivalenzschaltkreis und Dateninterpretation

In der komplexen Darstellung indiziert die Übergangsfrequenz der Geraden in den Halbkreis das Aussetzen von Elektrodenpolarisationsprozessen (Kap. 1.5.3). Verschwinden die Einflüsse dieser Prozesse auf die Systemimpedanz mit steigenden Frequenzen, so kann diese allein durch den Widerstand (R_{Bulk}) und die Kapazität (C_{Bulk}) des die Elektrode umgebenden Mediums (Bulkmedium) beschrieben werden. Im idealen Fall, welcher z.B. für reine Elektrolytlösungen gilt, stellt sich der Parallelschaltkreis von R_{Bulk} und C_{Bulk} als perfekter Halbkreis dar, dessen Zentrum sich auf der Abszisse befindet. Die Übergangsfrequenz ist abhängig vom Medium und von den Elektrodeneigenschaften. Die Einflüsse aller Elektrodeneffekte wurden unter Verwendung des im einleitenden Teil (Kap. 1.5.3) beschriebenen CPEs zusammengefasst.

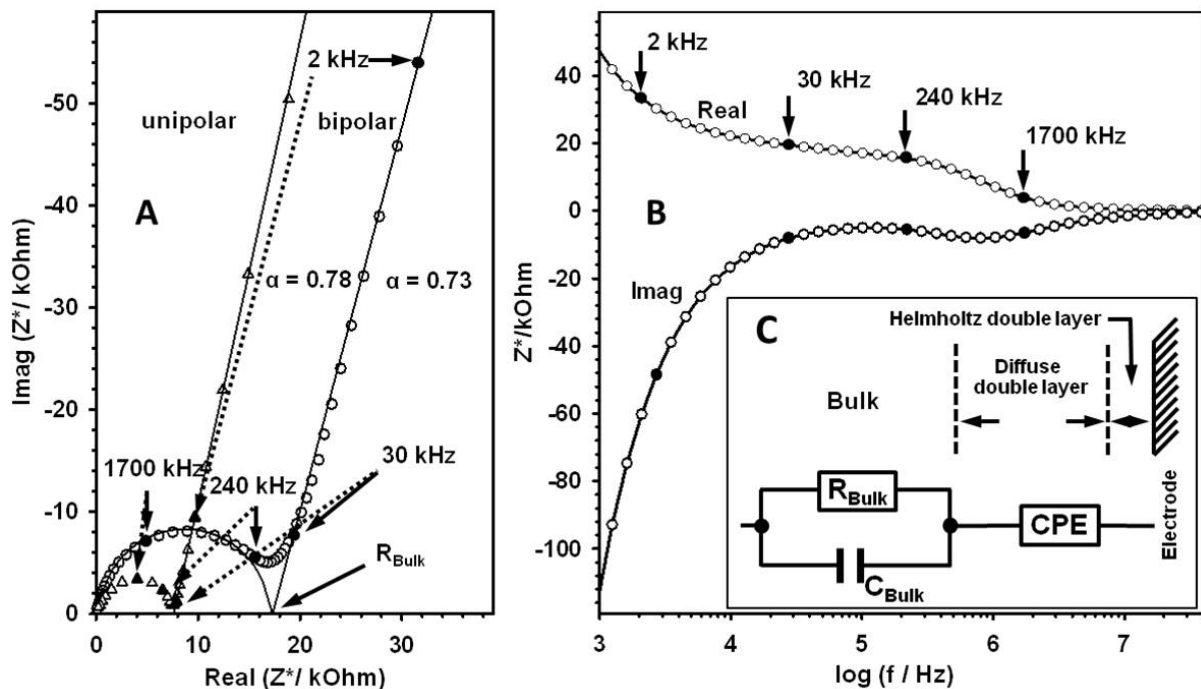


Abb. 18: Elektrodenreaktionen in Kalibrierflüssigkeit

(A) Komplexe Darstellung der Mittelwerte der Impedanzen von jeweils 4 bi- und unipolaren Elektroden gemessen in Kalibrierflüssigkeit mit einer spezifischen elektrischen Leitfähigkeit von $\rho_{cal} = 0,1307 \text{ Sm}^{-1}$. Die Streuungen wurden aus Rücksicht auf die Anschaulichkeit weggelassen. Das Diagramm verdeutlicht die Möglichkeiten unterschiedlicher Fitting-Methoden: Die Extrapolation der Geraden zu hohen Frequenzen hin, bzw. die des Halbkreises zu niedrigen Frequenzen hin, um den Elektrodenwiderstand R_{Bulk} zu ermitteln. (B) Darstellung der Real- und Imaginärteile der Impedanz der bipolaren Elektroden über der Frequenz. (C) Ersatzschaltbild, das für die Modellierung der Impedanz der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone verwendet wurde. R_{Bulk} und C_{Bulk} beschreiben die Eigenschaften des Bulkmediums, das CPE erfasst die Einflüsse der Elektrodeneffekte und der elektrischen Doppelschicht auf die Systemimpedanz (unter Vernachlässigung des Durchtrittswiderstandes und der Doppelschichtkapazität). Es ist zu beachten, dass R_{Bulk} gleich R_{cal} ist, wenn in Kalibrierflüssigkeit gemessen wird. Es ist weiterhin zu beachten, dass sich in den Kurven eine zusätzliche Eingangskapazität durch die Umgebung des Elektrodenschaftes widerspiegelt. Die Grafik wurde gemeinsam mit Dipl.-Ing. Thomas Kröger vom Lehrstuhl für Biophysik erstellt.

2.13. Die Zellkonstanten der THS-Elektroden

2.13.1. Experimentelle Bestimmung der Zellkonstanten

Die Zellkonstanten γ [m] wurden in Kalibrierflüssigkeit (HI77100C, HANNA Instruments Deutschland GmbH) mit einer spezifischen elektrischen Leitfähigkeit von $\sigma_{cal} = 0,1307 \text{ Sm}^{-1}$ gemessen, was einer spezifischen Resistivität von $\rho_{cal} = 7,6511 \text{ }\Omega\text{m}$ bei 21,3 °C entspricht. Die Leitfähigkeit wurde mit einem Temperatur-kompensierten Leitfähigkeitsmessgerät (Seven2Go, Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) überprüft. Die EIS-Spektren uni- und bipolarer Elektroden (4 Elektroden pro Typ) wurden mit einem Impedanzspektrometer (4194A Impedance/ Gain-Phase Analyzer, Hewlett Packard, Palo Alto, USA) gemessen und als Real- und Imaginärteile in der komplexen Darstellung (Abb. 18A), sowie über der Frequenz (Abb. 18B) dargestellt.

Die Zellkonstante γ wurde mit der Leitfähigkeit σ_{cal} der Kalibrierflüssigkeit und des Elektrodenwiderstandes R_{cal} berechnet, der sich aus der Elektrodenimpedanz in Kalibrierflüssigkeit ergab:

$$\gamma = \frac{1}{\sigma_{cal} R_{cal}} = \frac{\rho_{cal}}{R_{cal}} \quad (2)$$

ρ_{cal} ist die spezifische Resistivität der Kalibrierflüssigkeit.

Für die Bestimmung von R_{cal} war es notwendig die Einflüsse von CPE und dem Bulkmedium getrennt voneinander zu betrachten. Hierfür wurde die phänomenologische Interpretation des Impedanzverhaltens in Kalibrierflüssigkeit herangezogen (Abb. 18A). Während der niederfrequente Teil der EIS-Messdaten durch lineare Regression gefittet werden kann, geschieht dies beim hochfrequenten Teil durch fitten des Halbkreises [Asami 2002, Gimsa *et al.* 2005]. Prinzipiell resultieren die Extrapolation der Geraden zu hohen Frequenzen hin und die des Halbkreises zu niedrigeren Frequenzen hin im gleichen Punkt auf der Abszisse, welcher dem Elektrodenwiderstand R_{cal} entspricht. Aus Gleichung (2) ergibt sich daraus die Zellkonstante [Nowak *et al.* 2011]. Im Tiermodell stellen ρ_{Bulk} und R_{Bulk} integrative Parameter dar, die zeitabhängigen Einflüssen des die Elektrode umgebenden Mediums (Bulkmedium: interstitielle Flüssigkeit, Adventitia, neuronales Gewebe) unterworfen sind:

$$\rho_{Bulk} = \gamma R_{Bulk} \quad (3)$$

Von den zwei Methoden zur Extrapolation von R_{Bulk} aus der komplexen Funktion wurde das Fitten¹⁴ der Geraden zu hohen Frequenzen hin angewandt. Dieser Ansatz gewährleistet eine bessere Vergleichbarkeit der in Kalibrierflüssigkeit gemessenen Daten mit der *in-vivo*-Situation. Der Hauptgrund dieser Vermutung ist die komplexe Frequenzabhängigkeit der *in-vivo*-Impedanz. Diese wird in der Realität von den anisotropen Strukturen des Hirngewebes verursacht, da es an Grenzflächen (z.B.: Übergang von grauer zu weißer Substanz) zu Änderungen im Feldverlauf kommt. Die zusätzlichen Streuungen resultieren in einer Deformation und Abflachung des Halbkreises [Foster und Schwan 1989].

Die Analyse der Daten in Matlab, die lineare Regression und die experimentelle Bestimmung der Zellkonstanten erfolgten in Kooperation mit Dipl.-Ing. Thomas Kröger vom Lehrstuhl für Biophysik.

2.13.2. Numerische Bestimmung der Zellkonstanten

Zur Gegenprobe erfolgte die Bestimmung der Zellkonstanten numerisch mit der Finite-Elemente-Software Comsol Multiphysics® 4.2a. Die Berechnungen wurden von Dr. Marco Stubbe vom Lehrstuhl für Biophysik durchgeführt. Weiterführende Details beschreiben wir in Badstübner et al. [2016] (in Vorbereitung).

2.14. Verhaltenstests

Um läsions- und THS-bedingte Effekte beider Elektrodentypen auf das Verhalten von Hemiparkinson-Ratten bewerten zu können, wurden Experimente im Kurz- und Langzeitversuch, sowohl unter kontinuierlichen, als auch unterbrochenen Stimulationsbedingungen, d. h. dass der eigentliche Test erst nach Aussetzung von THS stattfand, durchgeführt. Im Laufe eines Experimentes wurde die gesamte Palette an Verhaltenstests jeweils zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten (vgl. Abb. 6) durchgeführt.

2.14.1. Apomorphin-induzierter Rotationstest

Der Apomorphin-induzierte Rotationstest nach Ungerstedt und Arbuthnott [1970] wurde mit selbstkonstruierten¹⁵ „Rodent-Rotometern“ (Abb. 19) durchgeführt, um asymmetrische Umdrehungen pro Minute zu quantifizieren. Die Applikation von Apomorphin (Apomorphin,

¹⁴ Das Fitten wurde von Dipl.-Ing. Thomas Kröger am Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock realisiert.

¹⁵ Gehäuse und Elektronik wurden von Dipl.-Ing. Thomas Kröger am Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock realisiert. Der mechanische Teil (Halterung, Bodenplatte, Laufbottich) wurde in Kooperation mit der Forschungswerkstatt der Universität Rostock am Zentrum für medizinische Forschung realisiert.

Material und Methoden

10mg/ml, Teclapharm GmbH, Lüneburg, Deutschland) erfolgte über die intraperitoneale Injektion von 0,25 mg Apomorphin/kg Körpergewicht der Ratte in 0,9%iger Kochsalzlösung. Die Ratten wurden in eigens dafür angefertigten, gepolsterten Schlingenhalterungen fixiert. Eine bauliche Anleitung kann Anhang 4 entnommen werden. Die Aufzeichnung der Rotationen begann 5 min nach Injektion und dauerte 40 min. Das Ergebnis wurde in Rotationen pro Minute (rpm) angegeben. Dabei wurde ein Rotationswert ≥ 2 rpm einer erfolgreichen Läsion gleichgesetzt und entsprechende Tiere in die Statistik aufgenommen. Eine vollständige Rotation definiert sich als 360° Drehung, die das Gerät als Wert „60“ am Display anzeigt, d.h. der angezeigte Wert musste noch durch 60 geteilt werden. Ein Protokoll für die Durchführung des Apomorphin-induzierten Rotationstests und für das Ansetzen der Injektionslösung befindet sich ebenfalls im Anhang 4.



Abb. 19: Apomorphin-induzierter Rotationstest mit „Rodent-Rotometern“

Vorrichtung zur automatischen Erfassung der Rotationen der Ratten um die eigene Körperachse. Die Ratten wurden mit einer Schlinge um den Bauch fixiert. Die Schlinge wurde aus Draht gefertigt, der im Kontaktbereich zur Ratte mit weichem Silikonschlauch ummantelt wurde, um Verletzungen zu vermeiden. Eine detaillierte Darstellung der Umsetzung der Schlinge kann Anhang 4 entnommen werden.

2.14.2. Stepping-Test

Der Stepping-Test wurde nach Olsson *et al.* [1995] und Schallert *et al.* [2000] durchgeführt. Der Test stellt eine Provokation von Ausfallschritten („adjusting-steps“) mit der beeinträchtigten und der gesunden Vorderpfote des Tieres dar. Die Ratten wurden bei dem Test mit einem speziellen beidhändigen Griff (Abb. 20) fixiert, sodass die Hinterpfoten in einem leicht stumpfen Winkel angehoben wurden und nur eine Vorderpfote den Untergrund berührte. Sodann wurde die Schrittzahl in Vor- und in Rückhandrichtung in einer definierten Zeit von 5 s über eine definierte Strecke von 90 cm bestimmt (Abb. 20A). Zusätzlich wurden die Schrittinitalisierungszeiten bestimmt (Abb. 20B), indem den Ratten, die nach oben beschriebenen Griff fixiert waren, ein Anreiz zur Schrittausführung gegeben wurde (z.B.: ihr Heimkäfig). Die Zeit bis zur Initiation des Schrittes wurde erfasst. Die Zeiten

wurden manuell erfasst. Im Nachhinein betrachtet wäre eine Videoaufzeichnung von Vorteil gewesen. Die Werte der „geschädigten“ Pfote wurden mit denen der „gesunden“ Pfote verglichen. Der Test sollte möglichst von immer der gleichen Person durchgeführt werden. Auf geruchsintensive Kosmetika sollte dabei unbedingt verzichtet werden.

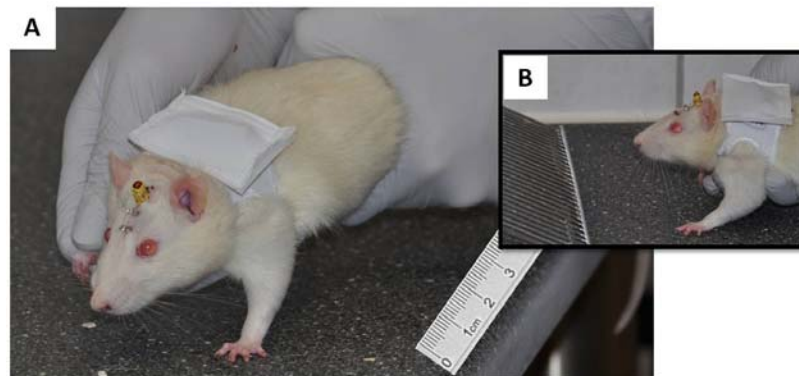


Abb. 20: Stepping-Test

Der Stepping-Test erfasst Änderungen der Vorderpfotenbeweglichkeit und ist deshalb ein gutes Modell für zwei der Hauptsymptome der Parkinsonerkrankung: des Rigors und der Akinesie, bzw. deren leichteren Form: der Hypokinesie, aber auch der Bradykinesie. Die Fotos zeigen: (A) Versuchsteil 1 zur Bestimmung der „adjusting-steps“ und (B) Versuchsteil 2 zur Bestimmung der Schrittinitalisierungszeiten. Es ist zu beachten, dass das Foto eine frühere Variante der implantationsseitigen chronischen Instrumentierung zeigt, bei welcher die von der THS-Elektrode abgehenden Kabel als „Krone“ mit Schrumpfschlauch fixiert wurden, bevor sie subkutan verlegt wurden. Diese Variante wurde von der in Abb. 15B und C vorstellten Methode für die Verhaltenstests ersetzt.

2.14.3. Korridor-Test

Im Korridor-Test nach Dowd *et al.* [2005] wurden die Tiere 5 min in einen 240 cm langen, 7 cm breiten und 23 cm hohen Korridor gesetzt. Im Korridor befanden sich in regelmäßigen Abständen beidseitig kleine Futternäpfe mit speziellen Zuckerpellets (5TUT, TestDiet®, USA). Nach zweitägiger Konditionierung und viertägiger Futterrestriktion (täglich einstündiges Futterangebot) konnten die Ratten den Korridor beim eigentlichen Versuch 5 min frei erkunden und Zuckerpellets fressen. Die Versuchsanordnung bestand aus zwei parallelen Korridoren, wobei einer mit gefüllten Futternäpfen zur Durchführung des eigentlichen Tests genutzt wurde. Der andere mit ungefüllten Futternäpfen diente einer 5-minütigen Konditionierung des Tieres kurz vor Testbeginn. Nach dem Durchlauf jeder Ratte wurden die Korridore mit 70%igem Ethanol gereinigt und die Futternäpfe mit jeweils 5 Pellets neu gefüllt. Die Zahl der Annäherungen an Futternäpfe zur kontra- und ipsilateralen Seite wurde manuell erfasst. Dabei wurde sowohl das Fressen der Pellets, als auch die bloße Annäherung an die Futternäpfe gezählt. Als Hilfsmittel der Erfassung von Annäherungen dienten zwei handelsübliche digitale Kurzzeitmesser, die jeweils in der rechten und linken Hand gehalten wurden. Durch Drücken mit dem Daumen auf z.B. die Minutentaste wurden die zum Teil in

recht schneller Abfolge statt findenden Zugriffe des Tieres erfasst. In Auswertung des Korridor-Tests wurde die Anzahl kontralateraler Annäherungen als Verhältnis zur Gesamtanzahl in Prozent angegeben. Eine Protokollvorlage für die Durchführung des Korridor-Tests kann Anhang 4 entnommen werden.



Abb. 21: Korridor-Test

Versuchstiere mit chronischer Instrumentierung während des Korridor-Tests nach Dowd *et al.* [2005]. Der Test eignet sich für die Bestimmung des läsions-bedingten sensomotorischen Neglects von unilateral läsionierten Ratten.

2.14.4. Offenfeld-Test

Für die Durchführung des Offenfeld-Tests nach Hall und Ballachey [1932] wurde eine selbstkonstruierte 46x45x40 cm³ große Polykarbonat-Box¹⁶ eingesetzt. Der Rand der Box war mit weißem, lichtundurchlässigem Lack besprüht. Der Boden wurde mit schwarzem, nicht-reflektierendem Kunststoff ausgelegt, um den Kontrast der weißen Tiere für die softwaregestützte Kameradetektion zu erhöhen. Die Bewegung der Tiere wurde von einem Sony-Camcorder aufgezeichnet, welcher in 125 cm Höhe über der Mitte der Arena installiert war. Die Kamera war über eine Firewire-Schnittstelle mit einem Desktop-PC verbunden. Für Verhaltenstests, bei denen die Ängstlichkeit gemessen wird, muss mit einer konstanten Beleuchtung gearbeitet werden. Hierzu wurde eine Leuchtquelle seitlich über dem Camcorder fixiert und die Lichtintensität auf der Bodenfläche mit einem Luxmeter gemessen. Für den Versuch wurden 200-250 Lux eingestellt. Für die automatische Registrierung verschiedener Parameter kam die Software Ethovision XT der Firma Noldus zum Einsatz. Die Arena wurde in eine periphere und eine zentrale Zone von ca. 22x22 cm (Abb. 22) eingeteilt. Diese Aufteilung erlaubt es, verschiedene Parameter zonenbezogen

¹⁶ In Kooperation mit der Forschungswerkstatt des Zentrums für Medizinische Forschung der Universität Rostock.

auszuwerten. Die Breite der peripheren Zone wurde mit 10 cm so gewählt, dass sie der Breite der Tiere bei paralleler Ausrichtung zur Wand entspricht. Die Registrierung begann, wenn das Tier mindestens eine Sekunde im Zentrum verweilte, woran sich eine 10-minütige Aufzeichnung anschloss. Um eine Beeinflussung der Tiere durch Gerüche zu vermeiden, wurde die Offenfeld-Arena nach jeder Messung mit 70%igem Ethanol gereinigt und Exkremente entfernt. Für die Ergebnisdarstellung wurden folgende Parameter herangezogen: Die (i) „insgesamt zurückgelegte Wegstrecke“ zur Beurteilung des motorischen Verhaltens und das (ii) „Verhältnis der Wegstrecke im Zentrum zur Gesamtwegstrecke“.

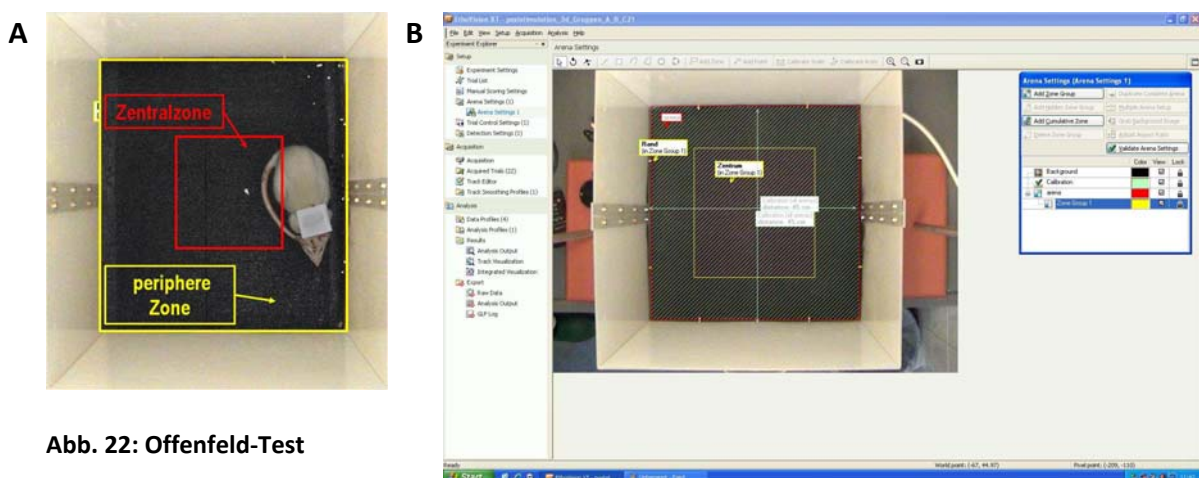


Abb. 22: Offenfeld-Test

(A) Instrumentierte Ratte in der Offenfeld-Arena, die in eine periphere und eine zentrale Zone aufgeteilt war. (B) Screenshot der Benutzeroberfläche der Trackingsoftware Ethovision XT (Noldus Information Technology), mit deren Hilfe Parameter zonenbezogen ausgewertet werden konnten. Neben der direkten Beurteilung der Motorik über beispielsweise die Geschwindigkeit, erlauben Parameter wie das „Verhältnis der zurückgelegten Strecke im Zentrum zur insgesamt zurückgelegten Strecke“ eine Beurteilung des ängstlichen Verhaltens.

2.15. Perfusion und Hirnentnahme

Nach Beendigung aller Verhaltenstests wurden die Ratten mit einer intraperitoneal verabreichten Überdosis an Ketamin/Xylazin¹⁷ getötet und zur Fixierung der Hirne mit einer 3,7%igen Paraformaldehydlösung perfundiert. Nach Feststellung des Todes, bzw. in tiefer Narkose (siehe Kap. 2.4) wurden die Ratten auf einem stabilen Styropordeckel mit Kanülen an Vorder- und Hinterpfoten fixiert und der Thorax zügig eröffnet. Mit einer spitzen scharfen Schere wurden die linke Herzkammer, sowie der rechte Vorhof angeschnitten. Durch die linke Herzkammer wurde eine stumpfe Glaskanüle¹⁸ in die Aorta eingeführt. Danach wurde

¹⁷ „Mousemix“, Rezeptur siehe Seite 15. Für die Tötung der Tiere reichte normalerweise die doppelte Dosis aus, die nach 5 min zum Tod führte.

¹⁸ Hierbei handelte es sich, um eine kundenspezifische Anfertigung der Glasbläserei der Universität Rostock. Alternativ kann eine 0,8 mm dicke Kanüle verwendet werden.

der Körperkreislauf mit 400 ml einer 3,7-%igen Paraformaldehydlösung durchströmt. Um den notwendigen Druck zu erzeugen wurde eine Infusionsflasche mit der Perfusionsflüssigkeit in ca. 2 m Höhe über der Ratte aufgehängt. Um den Durchfluss zu regeln wurde mit einem handelsüblichen Infusionsset (B. Braun Melsungen AG, Intrafix®SafeSet) gearbeitet.

Es erfolgte eine vorsichtige Hirnentnahme, wobei auf die Verwendung von stumpfen Präparationswerkzeugen geachtet wurde, um Beschädigungen des Hirngewebes zu vermeiden. Beschädigungen beeinträchtigen eine spätere Handhabung von histologischen Schnitten. Eine erfolgreiche Fixierung des Hirngewebes war an einer weißen Färbung ohne sichtbare Blutadern und an dessen fester Konsistenz zu erkennen. Nach Präparation lagerten die Hirne zur Nachfixierung 24 h bei 4°C in 3,7%iger Paraformaldehydlösung. Anschließend wurden die Hirne 24 h bei 4°C in einer Lösung aus PBS und 20%iger Saccharose-Lösung (handelsüblicher Zucker) entwässert. Schließlich wurden die Hirne schockgefroren, indem man sie für 5 min in -50 °C kaltem Isopentan absinken ließ. Bis zur Anfertigung von 30 µm Schnitten am Kryostaten bei ca. -20°C wurden die Hirne bei -80°C gelagert.

2.16. Arbeitsmethoden Histologie

2.16.1. Systematische Planung der histologischen Aufarbeitung von Rattenhirnen

Für die gesamte histologische Beurteilung wurden insgesamt vier verschiedene Hirnregionen in Betracht gezogen, diese sind: Striatum (Caudate Putamen, CPu), STN, SNpc und pedunculo pontine tegmentalis (PTg¹⁹). Dabei wurden die folgenden Färbemethoden²⁰ angewandt: (i) Nissl-Färbung für die Bestimmung der Gesamtanzahl an Neuronen in allen vier oben genannten Bereichen; (ii) Cholinacetyltransferase- (ChAT-) Färbung für die Bestimmung cholinergischer Neurone in den Bereichen CPu und PTg und (iii) Tyrosinhydroxylase- (TH-) Färbung für die Bestimmung von dopaminergen Neuronen in den Bereichen CPu und SNpc. Die Protokolle der einzelnen Färbungen können dem Anhang 4 entnommen werden.

Abb. 23 verdeutlicht die Systematik, nach welcher beim Färben der betreffenden Hirnregionen vorgegangen wurde.

¹⁹ Der PTg bei der Ratte entspricht dem PPTN beim Menschen.

²⁰ Die histologischen Arbeiten wurden hauptsächlich von den MTAs Franziska Alfen, Sigrid Neumann und Antje Hufen des Forschungslabors für experimentelle Neurologie und Neurobiologie durchgeführt.

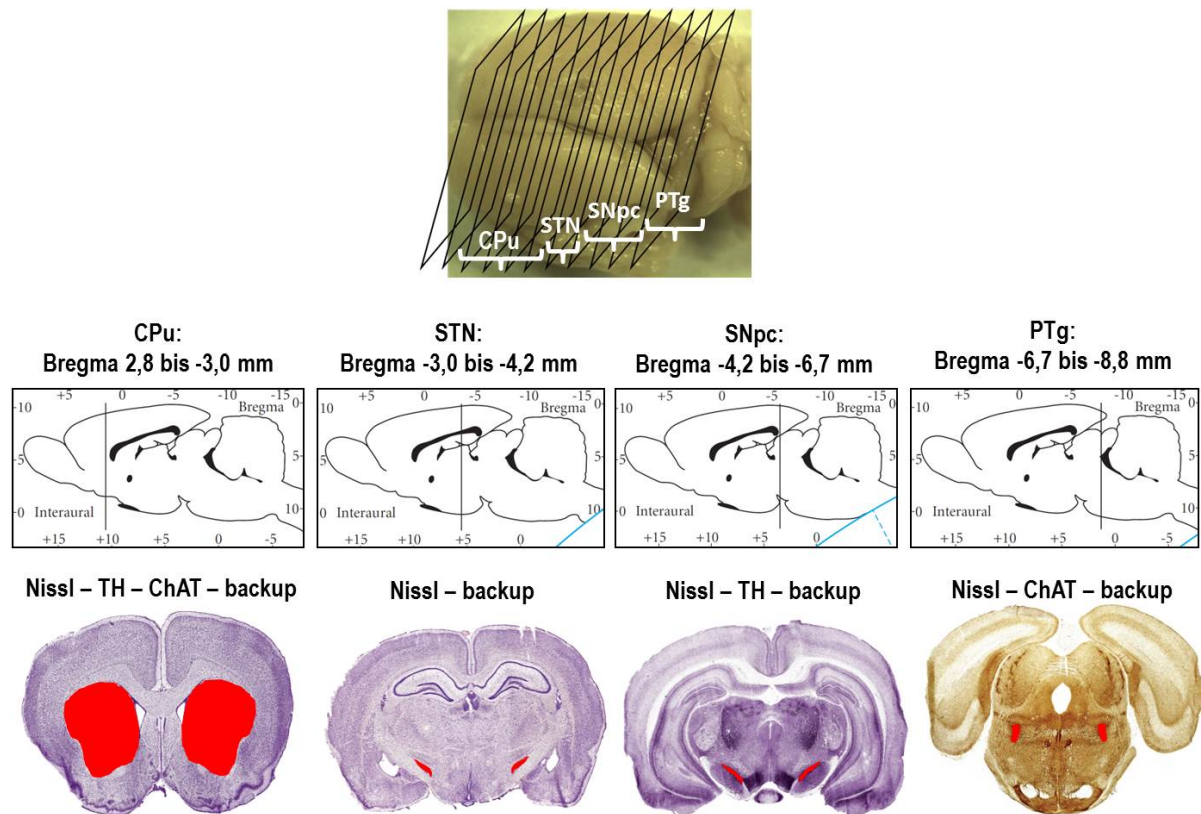


Abb. 23: Schnitt- und Färbe-Systematik für die histologische Beurteilung

Die Grafik verdeutlicht die Systematik, nach welcher beim Färben der betreffenden Hirnregionen vorgegangen wurde. Betrachtet wurden die Hirnbereiche CPU, STN, SNpc und PTg. Angegeben sind die Schnittbereiche bezüglich der Koordinaten des Bregmas nach Paxinos und Watson [2007]. Zusätzlich angegeben sind die „Schnittserien“ der angewandten Färbe-Methoden mit denen aufeinanderfolgende Kryostatschnitte gefärbt wurden. „backup“ bedeutet, dass der entsprechende Schnitt noch nicht gefärbt wurde und als Kontrolle zurückgestellt wurde. Bei offenen Fragen kann die Kontrolle auch zukünftig noch gefärbt werden. Die Schnittbilder wurden zur Anschauung dem Rattenhirnatlas von Paxinos und Watson [2007] entnommen und die untersuchten Bereiche rot markiert.

Ein Teil der Rattenhirne wurde im Rahmen dieser Arbeit nach oben beschriebener Systematik bereits histologisch aufgearbeitet. Der übrige Teil wurde ungeschnitten bei -80°C archiviert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte hauptsächlich die Etablierung der Arbeitsmethoden. Exemplarisch erfolgte jedoch die histologische Beurteilung repräsentativer Schnitte. Die quantitative Auswertung des histologischen Materials soll im Rahmen einer separaten Arbeit erfolgen. Für die Zukunft ist eine Korrelation der Ergebnisse der Verhaltenstests mit den Ergebnissen der quantitativen Auswertung der Schnitte wünschenswert.

2.16.2. Anfertigung von Kryostatschnitten

Die bei -80°C gelagerten Hirne wurden für die Anfertigung von 30 µm dicken Kryostatschnitten nach einem sich im Anhang 4 befindlichen Protokoll behandelt. Die Schnitte wurden entweder im „free floating“-Verfahren gefärbt oder vorher vereinzelt, auf Objektträger gezogen und dann gefärbt. Bei jeder „Schnittserie“ (Abb. 23) wurde ein sogenannter „backup“-Schnitt nicht gefärbt und als Kontrolle zurückgestellt. Ein Protokoll zur Anfertigung der Kryostatschnitte kann ebenfalls Anhang 4 entnommen werden.

2.16.3. Nachweis für cholinerge und dopaminerge Neurone in Hirngewebsschnitten

Cholinerge Neurone können mit dem Transmitter-synthetisierenden Enzym ChAT nachgewiesen werden, das als spezifisch für cholinerge Neurone gilt [McGeer *et al.* 1974, Kan *et al.* 1978]. In der vorliegenden Arbeit wurden exemplarisch die Bereiche CPu und PTg mit dieser Methode gefärbt. TH wird als Markerenzym für catecholaminerge Neurone beschrieben [Montagnese und Csillag 1996, Panzica *et al.* 1996]. Dopamin ist ein zur Gruppe der Katecholamine gehörender Neurotransmitter. Deshalb wurde vorgesehen dopaminerge Neuronen in den Bereichen CPu und SNpc mit dieser Methode nachzuweisen.

2.17. Untersuchung der Implantat-Gewebe-Kontaktzone

Für die Untersuchung²¹ der Implantat-Gewebe-Kontaktzone wurde eine 6-wöchig stimulierte 6-OHDA-läsionierte Ratte verwendet. Nach der Perfusion wurde das Hirn vorsichtig von ventral präpariert (Abb. 24). Dies war notwendig, um zum einen den Implantataufbau mechanisch nicht zu beanspruchen und zum anderen, um die Zone des Interesses (das Gewebe rund um die Elektroden spitze) freizulegen.

²¹ Die Untersuchung der Implantat-Gewebe-Kontaktzone (Einbettung, Schliff, REM und EDA) erfolgte in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Werkstoffe für die Medizintechnik (Prof. Behrend). Einbettung und Schliff wurden gemeinsam mit Frau Claudia Winkelmann durchgeführt, REM und EDA gemeinsam mit M.Sc. Ariane Busch. Die Kontrastierung mit Osmiumtetroxid wurde von mir am Institut für Pathologie nach Rücksprache mit Dr. Marcus Frank durchgeführt.

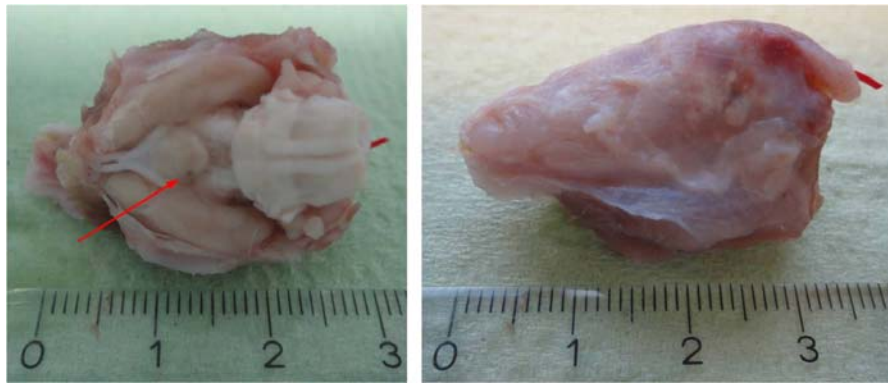


Abb. 24: Von ventral präpariertes Rattenhirn mit Elektroden-Implantat-Aufbau

Rechts: Ventrale Ansicht eines frei präparierten Rattenhirns in der Kalotte des Schädeldachs. Der Pfeil zeigt auf die Stelle der Elektrodenspitze, die ca. 1,5 mm unter der Oberfläche liegt und im Bild zu erkennen ist. Links: Laterale Ansicht des gleichen Hirns. Gut zu erkennen ist die Bindegewebskapsel, die den Implantataufbau („Kleberberg“ und austretende Kabel) umhüllt. Bei der Präparation für die Untersuchung der Implantat-Gewebe-Kontaktzone war darauf zu achten, dass der Implantataufbau mechanisch nicht beansprucht wurde.

Nach der Präparation wurden die Hirne 24 h bei 4°C in 3,7%iger Paraformaldehydlösung zur Nachfixierung gelagert. Zunächst musste möglichst viel Gewebe rund um das Interessensgebiet abgetragen werden. Eine Anforderung an die Präparation war, dass die Elektroden-Gewebe-Kontaktzone mechanisch nicht beansprucht wurde. Um dem Präparat Stabilität zu geben wurde das Gehirn für alle folgenden Präparationsschritte in der Kalotte des Schädeldachs belassen. Dazu wurde mit einem scharfen Skalpell vorsichtig das Gewebe bis auf 2 mm um den Elektrodenschaft (Abb. 25) abgetragen. Danach wurden die Proben für 2 h in Osmiumtetroxidlösung kontrastiert (Protokoll siehe Anhang 4). Osmiumtetroxid ist ein gängiges Kontrastmittel zum Anfärben von biologischem Material, das mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht werden soll. Nach der Kontrastierung erfolgte eine Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe. Im Anschluss daran wurden die Hirne in kaltaushärtendes Epoxidharz eingebettet. Anschließend wurde das Präparat mit einer Diamantsäge (well Diamantdrahtsägen GmbH, Mannheim, Deutschland) zu einem ca. 5x5 mm breitem und ca. 10 mm langen Präparat geschnitten, sowie senkrecht zum radialen Querschnitt der Elektrode angeschliffen und poliert (Abb. 25).

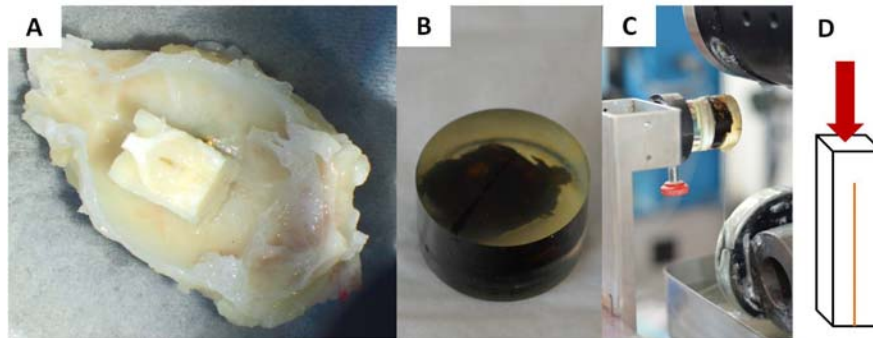


Abb. 25: Kontrastierung und Einbettung eines Rattenhirns

(A) Das fixierte und von ventral präparierte Rattenhirn wurde in der Kalotte des Schädeldachs belassen. Das Gewebe rund um den Elektrodenschaft wurde bis auf 2 mm abgetragen, um die Osmiumtetroxidlösung besser an den Ort des Interesses diffundieren zu lassen. Als Faustregel hierbei gelten 2 mm Gewebedurchdringung pro Stunde. (B) Mit Osmiumtetroxid kontrastierte und in Epoxidharz eingebettete Probe. (C) Mechanische Bearbeitung der Probe mittels Diamantsäge. (D) Skizze der Lage der Elektrode während des Schleifvorgangs.

Die oben beschriebenen Präparate wurden mittels REM- und EDA-Analyse (energiedispersive Röntgenanalyse; Quanta 3D 200i, FEI, Eindhoven, Niederlande) untersucht. Für die REM-Analyse wurde die geschliffene Oberfläche des Präparates mit einer leitfähigen Schicht aus Gold besputtert. Die Analyse erfolgte im „Low-Vacuum“-Modus bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV. Zusätzlich wurde eine EDA-Analyse der Probe vorgenommen. Hierbei werden Atome in der Probe durch einen Elektronenstrahl einheitlicher Energie angeregt, wobei diese dann in der Folge eine Element-spezifische Röntgenstrahlung aussenden. Diese charakteristische Röntgenstrahlung gibt Aufschluss über die Elementzusammensetzung der Probe. Die REM- und EDA- Analysen, sowie die notwendige Objektvorbereitung (Sputtern) erfolgten am Lehrstuhl für Werkstoffe für die Medizintechnik in Warnemünde und wurden gemeinsam mit M.Sc. Ariane Busch durchgeführt.

2.18. Statistik und Gruppengröße

Die statistische Auswertung der Verhaltenstest-Ergebnisse erfolgte mit dem Student-t-Test für gepaarte Beobachtungen, um die Ergebnisse der Verhaltenstests zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe vergleichen zu können. Signifikante Versuchsergebnisse wurden in den Diagrammen wie folgt gekennzeichnet: ★★: $p \leq 0,01$; ★: $p \leq 0,05$ und b (starker Trend, engl.: „borderline“): $0,05 < p \leq 0,08$. Die Sterne auf den schwarzen Säulen beziehen sich auf den Vergleich mit den weißen Säulen. Alle anderen Sterne beziehen sich jeweils auf den Vergleich mit den schwarzen Säulen.

Bei den Versuchen handelte es sich um wissenschaftliches Neuland. Grundsätzlich ist ein Erkenntnisgewinn nur dann zu erreichen, wenn eine nach den Gesetzen der Biometrie

hinreichende Versuchstierzahl pro Tiergruppe untersucht wird. In analogen Versuchen der Arbeitsgruppe des Institutes für Anatomie im gleichen Tiermodell²² wurden 8 Tiere pro Gruppe als ausreichend erachtet [Wree *et al.* 2011, Holzmann *et al.* 2012, Antipova *et al.* 2013]. Typischerweise ist die Streubreite gerade bei Apomorphin-induzierten Rotationen im 6-OHDA-Parkinsonmodell sehr hoch. Sie reicht vom kompletten Ausbleiben der biologischen Reaktion bis zu sehr stark rotierenden Tieren. Im Verlauf der Versuchsdauer kam es teilweise zu einer Reduktion der Gruppengröße. Die Ausfälle kamen z.B. durch Defekte der chronischen Instrumentierung zustande oder durch Tiere, die Schwächeanzeichen zeigten und somit einen Abbruch des Versuchs nahelegten. Die in den Diagrammen der Verhaltenstests angegebenen Gruppengrößen entsprechen der Anzahl der Tiere zum Zeitpunkt des finalen Apomorphin-induzierten Rotationstests.

3. Ergebnisse

3.1. Lokalisationskontrolle der Zielgebiete für stereotaktische Operationen

3.1.1. Lokalisationskontrolle für 6-OHDA Läsionierung

Ob die Zielregion MVB getroffen wurde, konnte anhand der Ergebnisse des Apomorphin-induzierten Rotationstests beurteilt werden. Danach erfolgte die Einteilung in die Versuchsgruppen.

Zur Visualisierung der Verteilung des Injektionsvolumens bei der 6-OHDA Läsionierung wurde zusätzlich bei einem Versuchstier eine Injektion mit 5 µl handelsüblicher Tinte vorgenommen, die mittels einer Hamiltonspritze im Bereich des MVB appliziert wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 26 dargestellt.

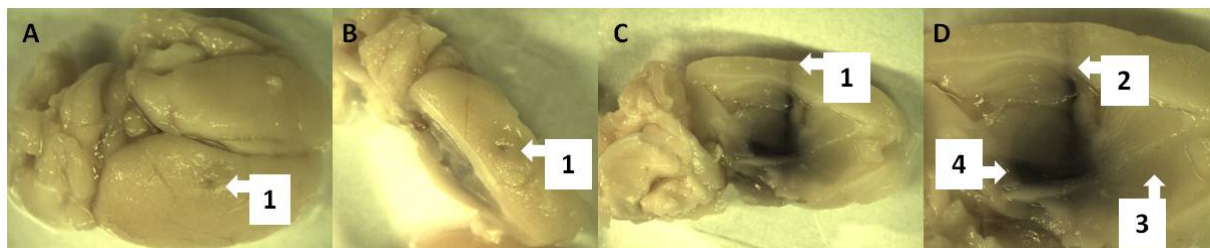


Abb. 26: Lokalisationskontrolle für 6-OHDA Läsionierung mittels Tinteninjektion

In 3,7%iger Paraformaldehydlösung fixiertes Rattenhirn. (A) Komplettes Hirn mit Einstichstelle (1) auf der rechten Hemisphäre. (B) Laterale Schnittsektion der rechten Hemisphäre im Bereich der Einstichstelle. (C) Laterale Ansicht der Schnittsektion: Gewebe wurde bis zum Injektionskanal abgetragen. (D) Vergrößerter Ausschnitt aus (C) mit dem Injektionskanal (2), dem CPu (3) und anderen Teilen der Basalganglien (4), die im Bereich der Ausbreitung der "Tintenwolke" liegen.

²² Versuche mit intrastriataler Behandlung von Botulinum-Neurotoxin.

3.1.2. ChAT-Färbung

Abb. 27 zeigt ChAT-gefärbte Kryostatschnitte beider Hemisphären im Bereich des CPu einer 6-OHDA-läsionierten Ratte, die einer 3-wöchigen Schein-THS-Behandlung unterzogen wurde. Deutlich zu erkennen sind die dunkel gefärbten cholinergen Neurone. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen ist kein besonderer Unterschied zwischen rechter und linker Hemisphäre zu erkennen. Nähere Informationen wird die zukünftige quantitative Auswertung aller Schnitte liefern.

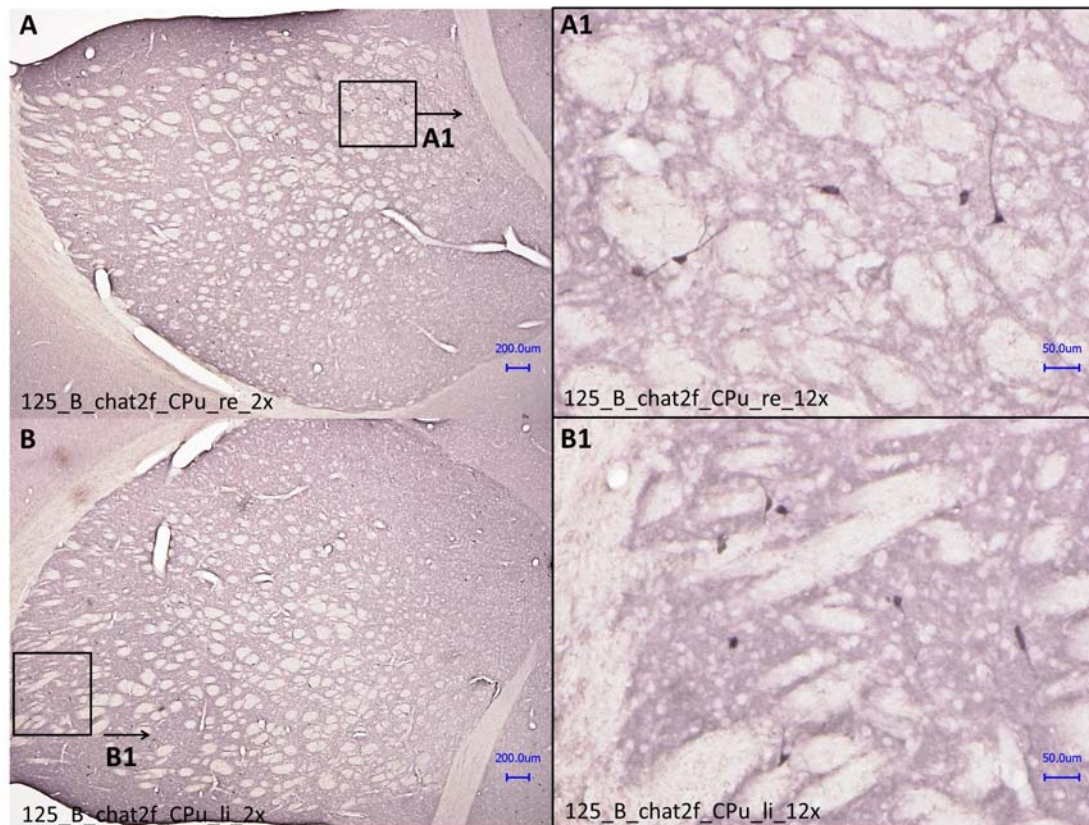


Abb. 27: ChAT-gefärbte Schnitte

Mikroskopische Aufnahmen (VHX-5000, KEYENCE Deutschland GmbH, Neu-Isenburg) ChAT-gefärbter Kryostatschnitte im Bereich des CPu einer 6-OHDA-läsionierten Ratte, die einer 3-wöchigen Schein-THS-Behandlung unterzogen wurde. (A) rechte Hemisphäre, (B) linke Hemisphäre. Deutlich zu erkennen sind die dunkel gefärbten cholinergen Neurone.

3.1.3. Lokalisationskontrolle für Elektrodenimplantation

Für die Verifikation der Zielkoordinate STN wurden exemplarisch Nissl-gefärbte Schnitte mikroskopisch untersucht (Abb. 28). Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Spitze der Elektrode im Bereich des Zielgebietes befand. Den Gesamtumfang an histologisch auswertbarem Material zu bearbeiten, war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen und hätte den zeitlichen Rahmen bei weitem gesprengt. Die Hirne aller Ratten, bzw. die Schnitte bereits histologisch aufgearbeiteter Hirne (siehe Kap. 2.16.1) sind für

Ergebnisse

nachfolgende wissenschaftliche Arbeiten an der Klinik für Neurologie der Universität Rostock archiviert.

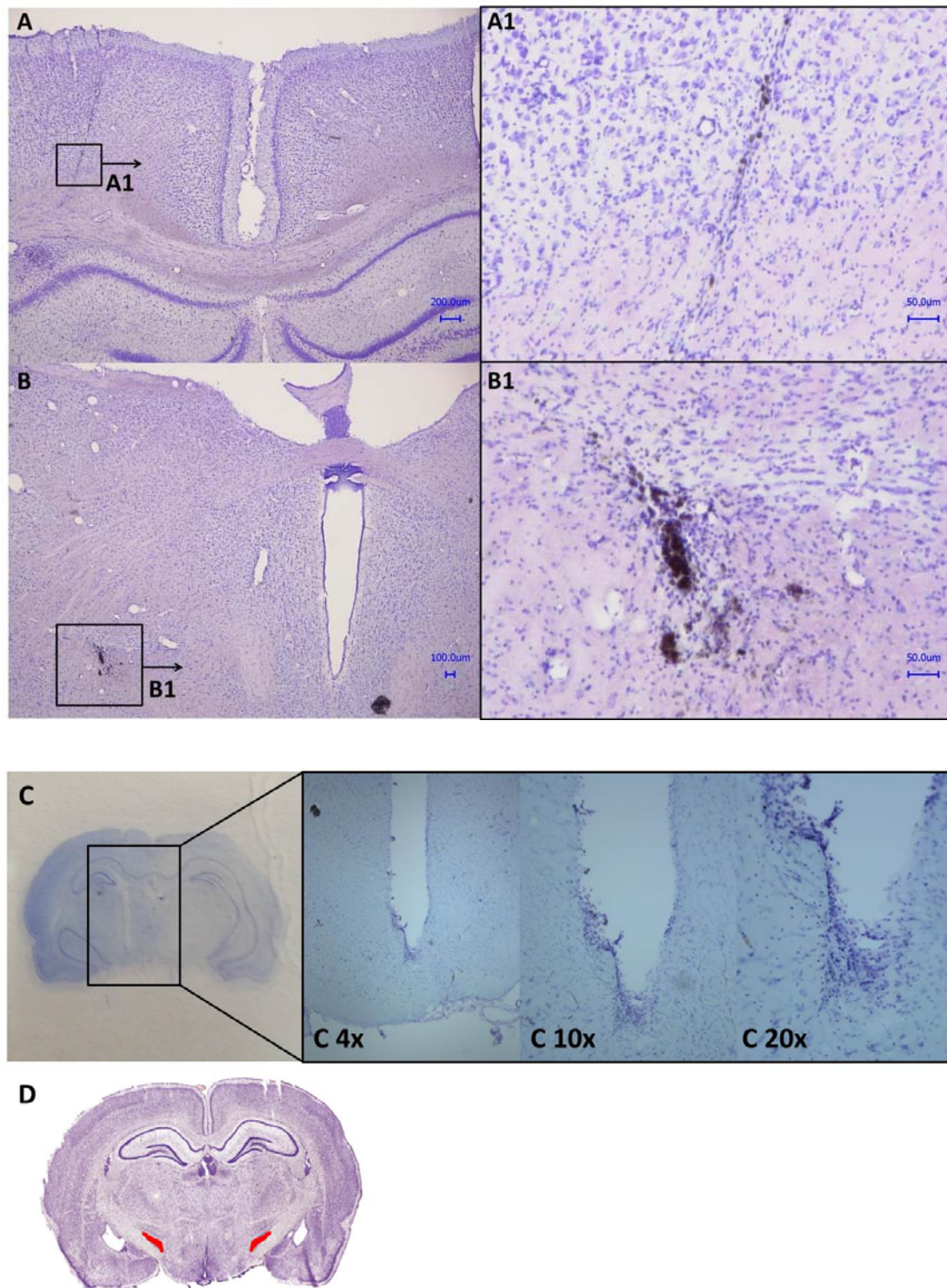


Abb. 28: Nissl-gefärbte Schnitte zur retrospektiven Lokalisationskontrolle des Zielgebietes STN

Mikroskopische Aufnahmen (VHX-5000, KEYENCE Deutschland GmbH, Neu-Isenburg) Nissl- gefärbter, koronaler Kryoschnitte: (A, B) Ratte aus der Gruppe „6-OHDA_sham_3w“ (läsioniert, 3 Wochen Schein-THS). (C) Gruppe „6-OHDA_bi_3w“ (läsioniert, 3 Wochen THS). In beiden Fällen wurde eine bipolare Elektrode implantiert. In der jeweils rechten Hemisphäre (durch die spiegelverkehrte Aufnahme links in den Bildern) zeigen sich deutliche Veränderungen, die durch die Elektrodenimplantation und/oder THS verursacht wurden. (A) im Bereich des Cortex und (B, sowie C) im Bereich des STN. (D) Zum Vergleich: Nissl-gefärbter Schnitt aus dem Rattenhirnatlas nach Paxinos und Watson [2007] mit hervorgehobenen Bereich des STN.

3.1.4. TH-Färbung

Abb. 29 zeigt TH-gefärbte Kryostatschnitte beider Hemisphären im Bereich der SNpc einer 6-OHDA-läsionierten Ratte, die einer 3-wöchigen Schein-THS-Behandlung unterzogen wurde. Deutlich zu erkennen sind die Unterschiede zwischen rechter und linker Hemisphäre. Auf der 6-OHDA-läsionierten Seite (rechts, Abb. 29A1) zeigen sich deutlich weniger dopaminerge Neuronen.

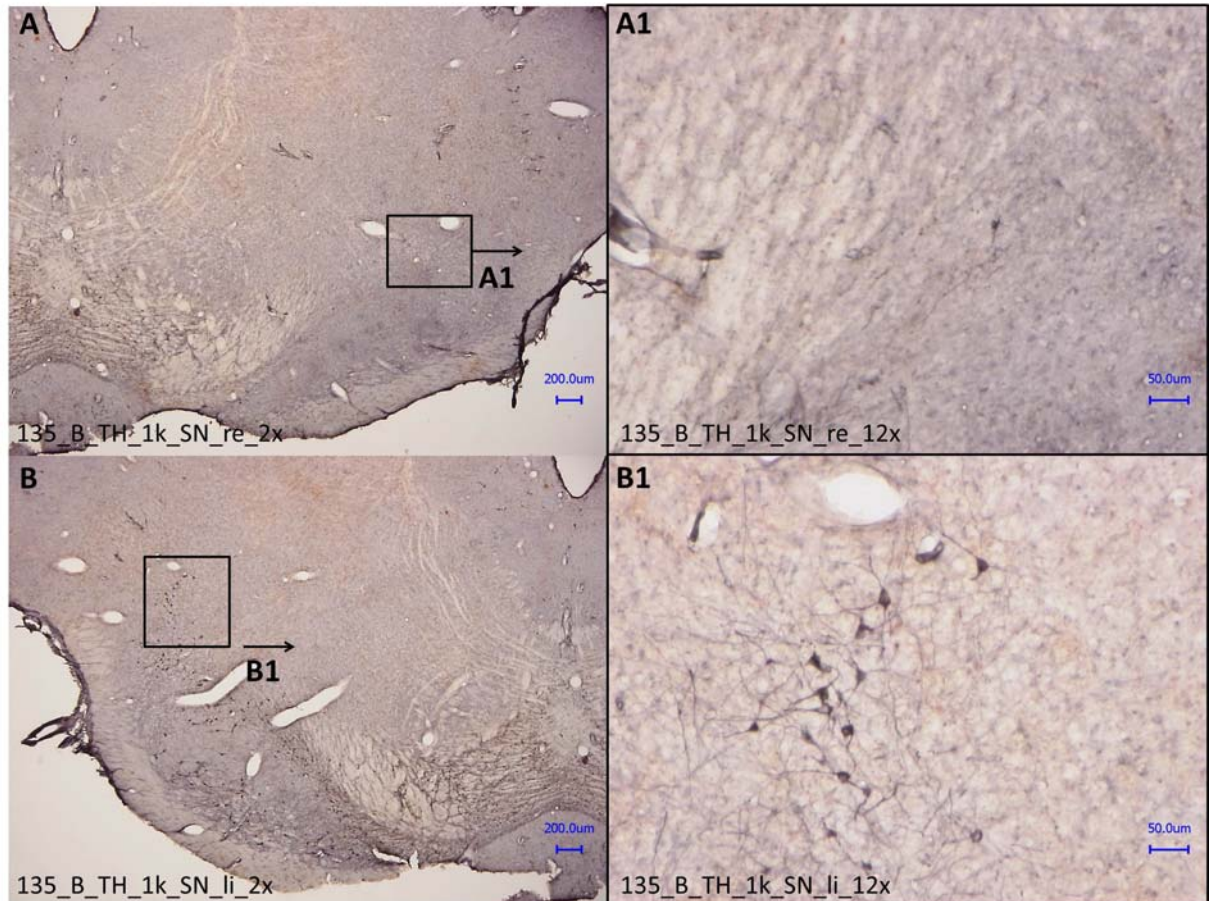


Abb. 29: TH-gefärbte Schnitte

Mikroskopische Aufnahmen (VHX-5000, KEYENCE Deutschland GmbH, Neu-Isenburg) TH-gefärbter Kryostatschnitte im Bereich der SNpc einer 6-OHDA-läsionierten Ratte, die einer 3-wöchigen Schein-THS-Behandlung unterzogen wurde. (A) rechte Hemisphäre, (B) linke Hemisphäre. Deutlich zu erkennen ist, dass sich im Schnitt der rechten Hemisphäre auffallend weniger dopaminerge Neuronen zeigen. Die rechte Hemisphäre wurde 6-OHDA-läsioniert.

3.2. Etablierung der chronischen Instrumentierung

Für die Langzeit-THS von vollkommen freibeweglichen Ratten wurde ein miniaturisiertes Stimulatorsystem (Abb. 15C) entwickelt, das in Kombination mit den erarbeiteten Methoden zu einem erfolgreichen Einsatz von 6-wöchiger THS führte. Die Etablierung eines Modells für chronische Instrumentierung setzte die Umsetzung folgender Teilprojekte voraus: (i) Erarbeitung einer Methode für den implantativen Ansatz (Kap. 2.8); (ii) Realisierung einer extrakorporalen Zusammenfassung (Tragvariante) der Komponenten (Kap. 2.10) und Entwicklung des elektronischen Teils²³ (Kap. 2.9).

3.3. EIS

3.3.1. Elektrodeneigenschaften: Experimentelle und numerische Zellkonstanten

Die hohe Übereinstimmung der experimentellen²⁴ mit den numerisch²⁵ ermittelten Zellkonstanten legt nahe, dass beide Bestimmungsmethoden in gleichem Maße und sehr gut für eine gegenseitige Überprüfung geeignet sind (Tab. 7). Die Zellkonstanten der uni- und bipolaren Elektroden unterscheiden sich um den Faktor 2,28 im Falle der experimentellen Messungen und um den Faktor 2,37 bei den Simulationen.

Tab. 7: Zellkonstanten

Die Bestimmung erfolgte in Kalibrierlösung mit einer spezifischen elektrischen Leitfähigkeit von $\sigma = 0,1307 \text{ Sm}^{-1}$. Die unipolaren Elektroden wurden gegen eine Gegenelektrode aus Golddraht gemessen.

Elektrodentyp	Messungen ²²			Numerische Ergebnisse ²³
	$R_{cal} [\Omega]$	$\sigma [\text{Sm}^{-1}]$	$\gamma \pm SD [m]$	$\gamma [m]$
Bipolar	17544,56	0,1307	$4,60 \text{ E-}04 \pm 1,30 \text{ E-}04$	$4,18 \text{ E-}04$
Unipolar	7963,29	0,1307	$1,05 \text{ E-}03 \pm 2,51 \text{ E-}05$	$9,89 \text{ E-}04$

²³ Entwicklung in Kooperation mit den Firmen Steinbeis-Zentrum STZ1050 (Rostock, Deutschland) und Rückmann & Arndt (Berlin, Deutschland).

²⁴ Die Bestimmung der experimentell ermittelten Zellkonstanten erfolgte in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. Thomas Kröger von Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock.

²⁵ Die numerische Bestimmung der Zellkonstanten wurde von Dr. Marco Stubbe vom Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock durchgeführt.

3.3.2. EIS-Messungen im Rattenhirn

Die Ergebnisse der EIS-Messungen von Experiment III und IV sind in den Abbildungen Abb. 30 - Abb. 34 dargestellt. Die Daten der Vorversuche (nicht abgebildet) aus Experiment I und II (Tab. 6) zeigten einen generellen Anstieg der Impedanz im Verlauf des Einwachsprozesses. Die Messungen sind gekennzeichnet von einem charakteristischen Abfall der Impedanz am zweiten Messtag nach Implantation gefolgt von einem signifikanten Anstieg vom dritten Tag an. EIS-Messungen einer unipolaren Elektrode, die in Kombination mit einer subkutan implantierten Gegenelektrode aus Zahnspangendraht gemessen wurde (Experiment I) ergaben, dass sich der Wert des Realteils der gemessenen Impedanz verglichen mit seinem Ausgangswert bei 10 kHz nach 12 Tagen mehr als verdoppelte.

Messungen mit unipolaren Elektroden, die gegen Wundklammern unterschiedlicher Anordnung gemessen wurden (Experiment II) zeigten, dass sich der Wert des Realteils verglichen mit seinem Ausgangswert bei 10 kHz nach 22 Tagen fast verzehnfachte. Parallel dazu, nahmen die Imaginärteile der Impedanz ab. Die Ergebnisse der Vorversuche und speziell die EIS-Messungen aus Experiment II zeigten, dass der Einfluss der Position, des Materials und der Geometrie der Gegenelektrode auf die Systemimpedanz vernachlässigbar ist.

Abb. 30 zeigt EIS-Messungen mit den bipolaren Elektroden im Frequenzbereich von 100 Hz bis 100 kHz in Abhängigkeit des Tages nach Implantation. Die Spektren der Realteile wurden aus den Daten von vier verschiedenen Ratten gemittelt. Der Wert des Realteils erhöhte sich im Vergleich zu seinem Ausgangswert bei 10 kHz nach 7 Tagen von ungefähr 25 k Ω auf etwa 40 k Ω . Wie bereits in den Vorversuchen gezeigt, konnte anhand der Spektren unter 14 kHz ein charakteristischer Abfall der Impedanz am zweiten Tag nach Implantation beobachtet werden. Danach steigt die Impedanz bis zum siebten Messtag systematisch an.

Trotz des charakteristischen Verhaltens im niedrigeren Frequenzbereich der Spektren deutet die Zunahme der Realwerte bei niedrigeren Frequenzen auf einen steigenden Einfluss der Elektrodenprozesse hin [Onaral und Schwan 1982, Gimsa *et al.* 2005]. Diese Elektrodenprozesse machen die Extraktion, bzw. Interpretation von Gewebe-EIS-Daten schwierig.

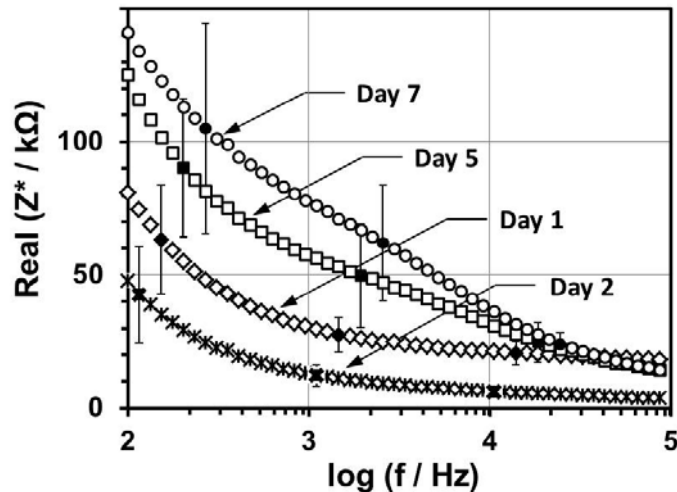


Abb. 30: EIS-Messungen von 4 bipolaren Elektroden

In-vivo-EIS-Verläufe des Realteils der Impedanz Z^* von vier implantierten, bipolaren Pt/Ir-Elektroden gemittelt über 7 Tage. Das Diagramm verdeutlicht den charakteristischen Abfall der Impedanz am zweiten Messtag nach Implantation. Dieses Phänomen konnte bei nahezu jeder Messung beobachtet werden und wird mit einer erhöhten Ansammlung von Wundwasser erklärt. Zur besseren Darstellung sind Standardabweichungen nur für einige Punkte (gefüllt) beispielhaft angegeben.

Die Beziehungen erscheinen noch komplizierter, wenn die kompletten EIS-Rohdaten aufgezeichnet werden. Abb. 31 zeigt Beispiele von EIS-Daten in der komplexen Darstellung.

Wie bei den Messungen der Elektrodenreaktionen in der Kalibrierlösung (Abb. 18) gezeigt, reflektieren die Anteile des Spektrums zu hohen Frequenzen hin Eigenschaften des Mediums in dem sich die Elektrode befindet. Dies ist in der komplexen Darstellung der Daten aus der Messung mit Kalibrierlösung als idealer Halbkreis erkennbar. In der Realität kommt es an den Grenzflächen (z.B. Übergang von Interstitialmedium zu Zellmembran und Zytoplasma) zu frequenzabhängigen Änderungen der elektrischen Feldverteilung, was zu einer Verzerrung und Deformation des Halbkreises führt [Foster und Schwan 1989, Krauss *et al.* 2004].

Der Vergleich von Abb. 18A (gemessene Elektroden in Kalibrierflüssigkeit) und Abb. 31 (gemessene Elektroden in Hirngewebe) verdeutlicht dies. Halbkreise, die einen größeren Bereich der Abszisse überspannen deuten auf einen höheren Widerstand des Gewebes um die Elektrode hin, wohingegen eine Ausdehnung des Halbkreises in y-Richtung mit einer höheren Kapazität korreliert.

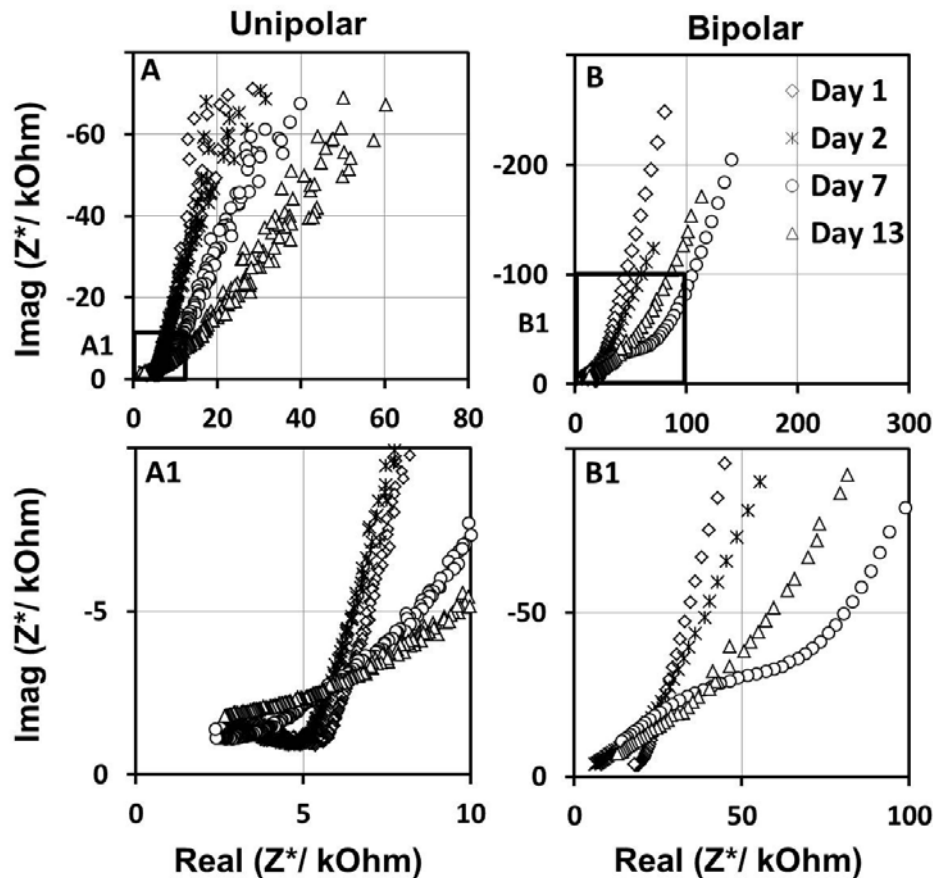


Abb. 31: Komplexe Darstellung des Impedanzverlaufs uni- und bipolarer Elektroden

Imaginärteil (Imag) der Impedanz Z^* als Funktion des Realteils (Real) (komplexe Darstellung) von (A) uni- und (B) bipolaren Elektroden in Abhängigkeit der Tage nach Implantation. Jede Kurve wurde im Frequenzspektrum von 100 Hz bis 10 MHz gemessen. Die Übergangsfrequenz der Geraden in den Halbkreis indiziert das Aussetzen von Elektrodenpolarisationsvorgängen und ist abhängig von den Elektroden Eigenschaften und dem Medium. Der Halbkreis beschreibt die Eigenschaften des Mediums, das die Elektrode umgibt (Gewebe und Interstitialflüssigkeit). Die Gerade spiegelt die Einflüsse von Elektrodenprozessen und der Doppelschicht wieder.

Jedoch erforderte die Datenauswertung täglicher EIS-Messungen von bis zu 6 Wochen eine detailliertere Betrachtung als dies mit der komplexen Darstellung zu veranschaulichen war, da die Systemimpedanz über die Zeit starken Schwankungen unterlag.

Aus diesem Grund wurde für die Auswertung der EIS-Daten die Extraktion eines aussagekräftigen Parameters vorgenommen, der es erlaubte das Einwachsverhalten der Elektroden in diesem Modell sinnvoll zu charakterisieren. Es ist der effektive spezifische elektrische Widerstand ρ des Gewebes um die Elektroden (Resistivität). Die Resistivität wurde für uni- und bipolare Elektroden nach Gleichung 3 berechnet und in Abhängigkeit der Tage nach Implantation aufgetragen. Abb. 32 und Abb. 33 zeigen die Ergebnisse.

Abb. 32 zeigt jeweils die gemittelten Ergebnisse von 4 implantierten bipolaren und 9 unipolaren Elektroden, wobei deutlich wird, dass sich der bipolare Kurvenverlauf stärker

verändert, als der unipolare. Hierbei steigt die Resistivität von ca. 10 Ωm auf ca. 29 Ωm an. Für unipolare Elektroden bildet sich dieses Verhalten schwächer ab.

Abb. 33 stellt die Verläufe der Resistivität von vier einzelnen bipolaren Elektroden dar, die zeigen, dass das Einwachsverhalten einem charakteristischen Trend folgt, aber dennoch individuell abgebildet werden kann.

Wie bei den Vorversuchen, sind auch die Messungen im Hauptversuch durch den charakteristischen Einbruch der Impedanz am 2. Messtag gekennzeichnet. Im Gegensatz zu den Vorversuchen wurde in den Hauptversuchen ab dem 8. Messtag THS angeschaltet, wobei zu diesem Zeitpunkt ein eindeutiger Abfall der Impedanz zu verzeichnen war. Veröffentlichungen anderer Forschergruppen bestätigen, dass die elektrische Stimulation die Stabilität der Systemimpedanz beeinflussen kann [Otto *et al.* 2006].

Lempka *et al.* [2009] zeigten an Untersuchungen im Affenhirn, dass sich die Impedanz der implantierten Elektroden nach ca. 5 Wochen stabilisiert. Diese Aussage konnte aufgrund der kleinen Gruppengröße ($n = 1$) ab der dritten Woche nach Implantation nicht verlässlich bestätigt werden. Das Diagramm in Abb. 34 zeigt den Verlauf von R_{Bulk} unipolarer Elektroden über einen Zeitraum von 36 Tagen.

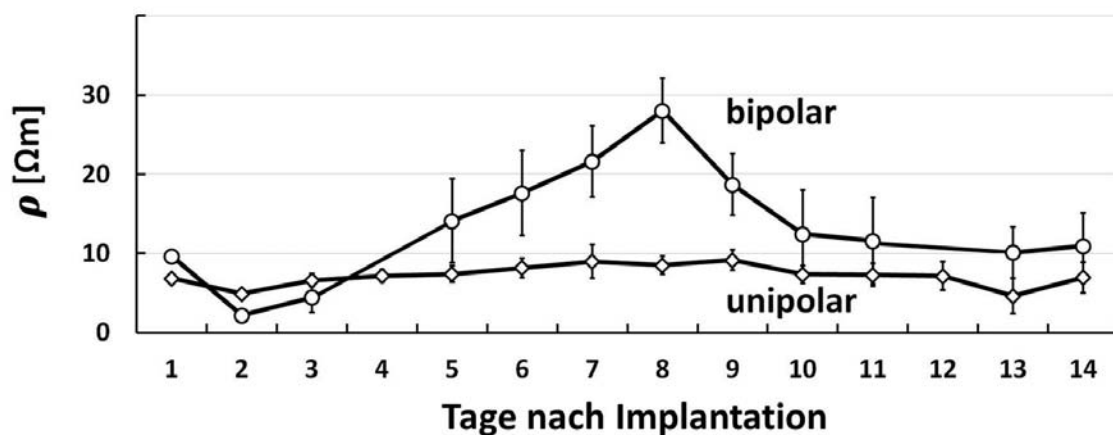


Abb. 32: „Einwachskurven“ uni- und bipolarer Elektroden

In-vivo-Verlauf der Resistivität des Gewebes um 4 implantierte bipolare Elektroden und 9 implantierte unipolare Elektroden. Letztere wurden gegen eine subkutane Gegenelektrode aus Golddraht gemessen. Beide Elektrodentypen wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen nach Implantation gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Es ist zu beachten, dass aufgrund von technischen Problemen bei der bipolaren Messreihe keine Daten am 4. und 12. Messtag aufgenommen werden konnten.

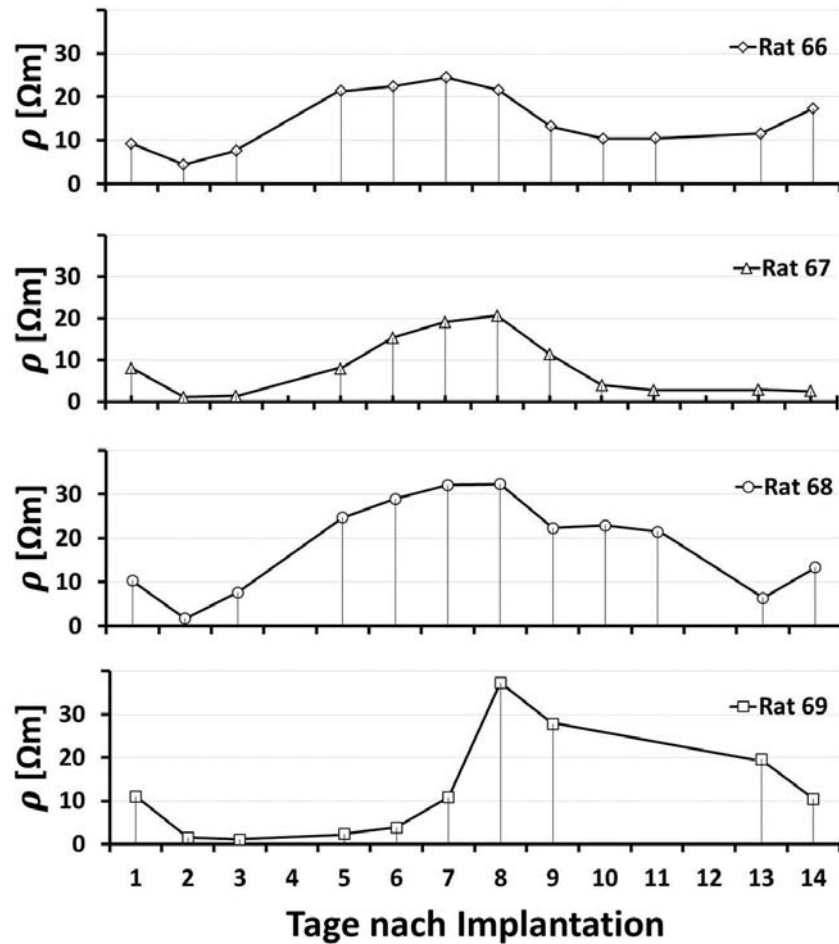


Abb. 33: Individuelle „Einwachskurven“ bipolarer Elektroden

In-vivo-Verlauf der Resistivität des Gewebes um 4 implantierte bipolare Elektroden im exemplarischen Einzelfall der jeweiligen individuellen Ratte über einem Zeitraum von 14 Tagen nach Implantation. Es ist zu beachten, dass an den Tagen 4 und 12 aufgrund von technischen Problemen keine Messwerte aufgezeichnet wurden. Im Fall von Ratte 69 ebenfalls nicht an den Tagen 10 und 11.

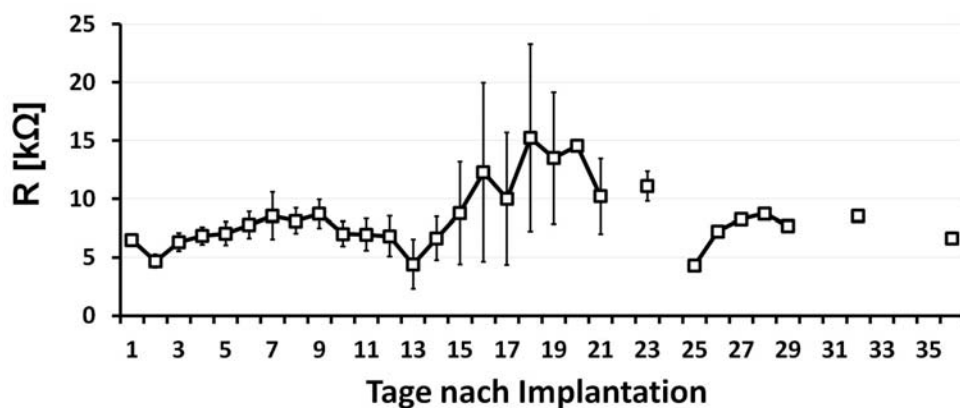


Abb. 34: Impedanzverlauf unipolarer Elektroden über 36 Tage

In-vivo-Verlauf des Widerstandes R_{Bulk} von 9 unipolaren Elektroden, die gegen eine Gegenelektrode aus Golddraht über einen Zeitraum von 36 Tagen nach Implantation gemessen wurden. Die Gruppengröße reduzierte sich ab dem 15. Messtag von anfänglich 9 auf 4 Tiere. Ab dem 25. Messtag stellt die Kurve nur noch das Messergebnis eines einzigen Tieres dar. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.4. Verhaltenstests

3.4.1. Umsetzung der Versuchsplanung

Die Ergebnisse der Verhaltenstests zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten sind anhand unterschiedlicher Säulenmuster in den Diagrammen (Abb. 35 - Abb. 42) grafisch dargestellt. Diese sind: (i) vor der 6-OHDA-Läsion (weiß); (ii) ca. 12-14 Tage nach der 6-OHDA-Läsion, bzw. nach der Schein-Läsion (schwarz) und (iii) nach den in den Diagrammen angegebenen Applikationszeiten für THS, bzw. Schein-THS (grau oder gestreift). Der inhaltliche und zeitliche Ablauf der Versuche ist in Abb. 6, Kap. 2.3 dargestellt und erläutert.

3.4.2. Lokomotorische Aktivität

Der Grad der Läsion wurde mit dem Apomorphin-induzierten Rotationstest ca. 12-14 Tage nach der Operation beurteilt. Die Erfolgsquote ($\text{rpm} \geq 2$) lag bei ca. 75%, die Sterberate war kleiner 10%.

Sowohl 3-tägige als auch 3-wöchige THS führte zu einer Reduktion pathologischer Apomorphin-induzierter Rotationen, wobei unipolare THS effektiver war, als bipolare. Ein persistierender Effekt konnte für mindestens 3 Tage nachgewiesen werden, da der Effekt auch dann noch signifikant war, als die THS bereits ausgeschaltet war (Abb. 35). Jedoch konnte dieser Effekt weder nach verlängerter THS (6 Wochen) noch nach 3-wöchiger Stimulation mit anschließendem 3-wöchigem Aussetzen der THS bestätigt werden.

In unbehandelten und Schein-läsionierten Ratten wurden erwartungsgemäß keine pathologischen Apomorphin-induzierten Rotationen detektiert.

Eine andere Situation liegt vor, wenn die spontane lokomotorische Aktivität im Offenfeld-Test beurteilt wird. Hier diene der Parameter „Insgesamt zurückgelegte Wegstrecke“ als Maß. In diesem Fall konnte eine Verbesserung ausschließlich nach unipolarer 3-wöchiger THS nachgewiesen werden (Abb. 41). Diese Verbesserung ist ein persistierender Effekt, denn der Test fand 3 Tage nach Abschaltung des Gerätes statt. In allen anderen Fällen hatte THS entweder keinen Effekt auf die Mobilität der Ratten oder sie führte gar zu einer Reduktion ihrer Bewegungsaktivität.

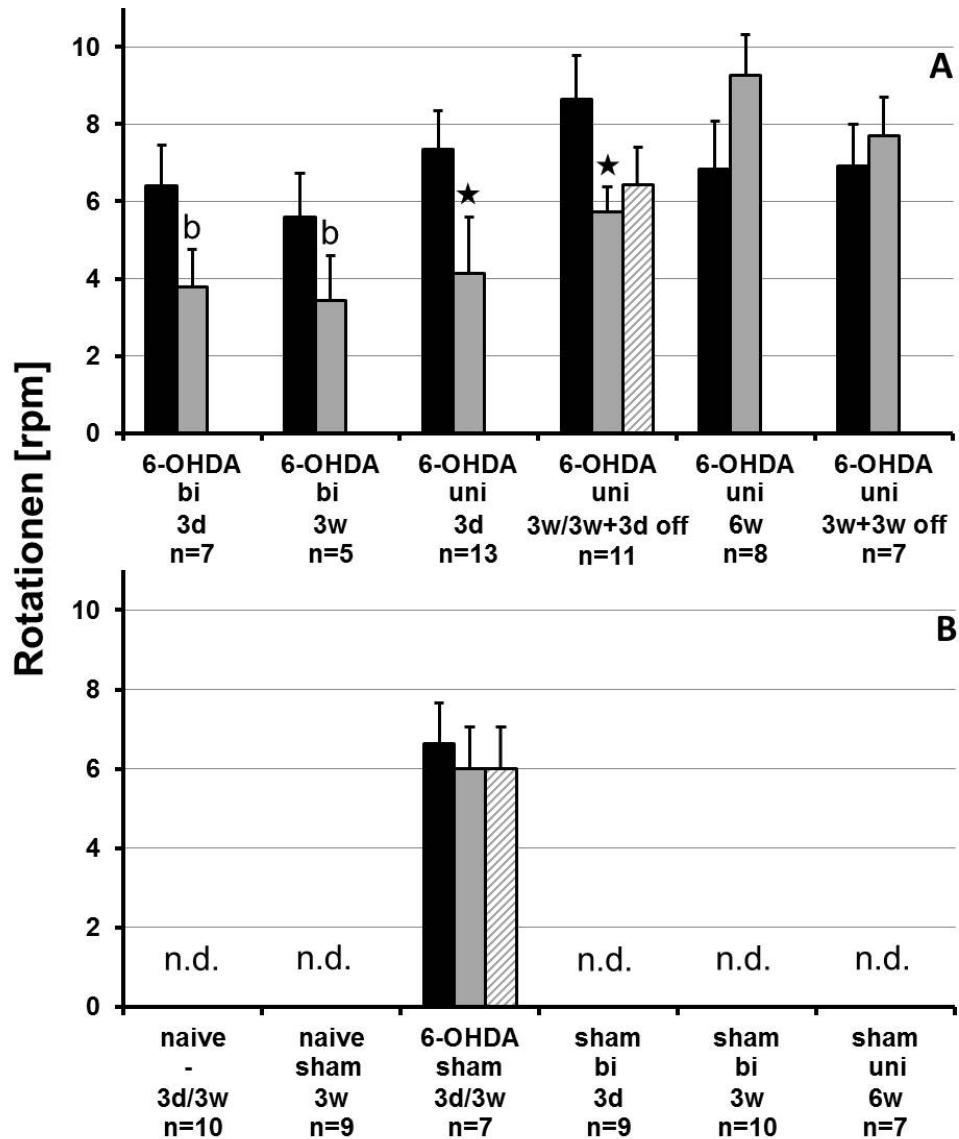


Abb. 35: Apomorphin-induzierter Rotationstest

Kurz- und langzeitige THS-Effekte uni- und bipolarer Elektroden gezeigt am Apomorphin-induzierten Rotationsverhalten von Hemiparkinson-Ratten. (A) und (B) beziehen sich jeweils auf Test- und Kontrollgruppen. Unterschiedliche Säulenmuster repräsentieren die Ergebnisse zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten; schwarz: ca. 12-14 Tage nach 6-OHDA-Läsion, bzw. nach Schein-Läsion; grau oder gestreift bezieht sich auf die jeweiligen im Diagramm angegebenen Applikationszeiten für THS, bzw. Schein-THS. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der ermittelten Rotationen pro Minute. Die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Student-t-Test für gepaarte Beobachtungen. ★★(hoch signifikant): $p \leq 0,01$; ★(signifikant): $0,01 < p \leq 0,05$; T(Trend): $0,05 < p \leq 0,08$.

3.4.3. Akinesie

Zur Untersuchung der Akinesie wurde der Stepping-Test herangezogen und mittels der Beurteilung seitlich forcierter Ausfallschritte, sowie der Bewegungsinitiationszeiten der Vorderpfoten durchgeführt.

In Auswertung der Bewegungsinitiation der kontralateralen Vorderpfote (Abb. 36) konnte eine signifikante Verbesserung der läsions-induzierten Akinesie nach 3-tägiger bipolarer THS nachgewiesen werden. Ein ähnlich positiver Effekt, wenngleich nur mit einem starken Trend, konnte im Falle 3-wöchiger bipolarer THS beobachtet werden. Zu signifikanten Verbesserungen der Bewegungsinitiationszeiten der kontralateralen Vorderpfoten ist es auch nach 3-wöchiger unipolarer THS mit anschließendem 3-wöchigem Aussetzen von THS gekommen. In der parallel geführten Testgruppe, die einer 6-wöchigen kontinuierlichen THS-Behandlung ohne Unterbrechung unterzogen wurde, war dieser Effekt nur mit einem starken Trend beobachtbar.

Unerwarteter Weise wurde bei zwei Gruppen ebenfalls bei den ipsilateralen Vorderpfoten eine Verschlechterung der Bewegungsinitiationszeiten nach der Läsion beobachtet (Abb. 37). Jedoch führte die THS hier in keiner der Gruppen zu einem vorteilhaften Effekt. Ganz im Gegenteil, in einem Fall führte die THS nach 3 Wochen bei den Bewegungsinitiationszeiten der ipsilateralen Vorderpfoten zu einer signifikanten Verschlechterung. Dieser Effekt verschwand, als die Testgruppe 3 Tage nach Abschaltung von der THS erneut getestet wurde.

Die Beurteilung der Vorderpfotenbeweglichkeit mit forcierten Seitwärtsschritten ergab lediglich in zwei Fällen einen signifikanten Effekt, wobei es entweder zu einer Verschlechterung der Symptomatik kam, oder der Effekt wurde in einer Scheingruppe beobachtet: (i) 6-wöchige unipolare THS führte zu einer Verschlechterung (Abb. 38A) und (ii) 3-wöchige Schein-THS gesunder Ratten führte zu einer Verbesserung der Beweglichkeit der kontralateralen Vorderpfote in Vorhandrichtung (Abb. 38B).

In Rückhandrichtung (Abb. 39) konnten keine signifikanten Effekte detektiert werden.

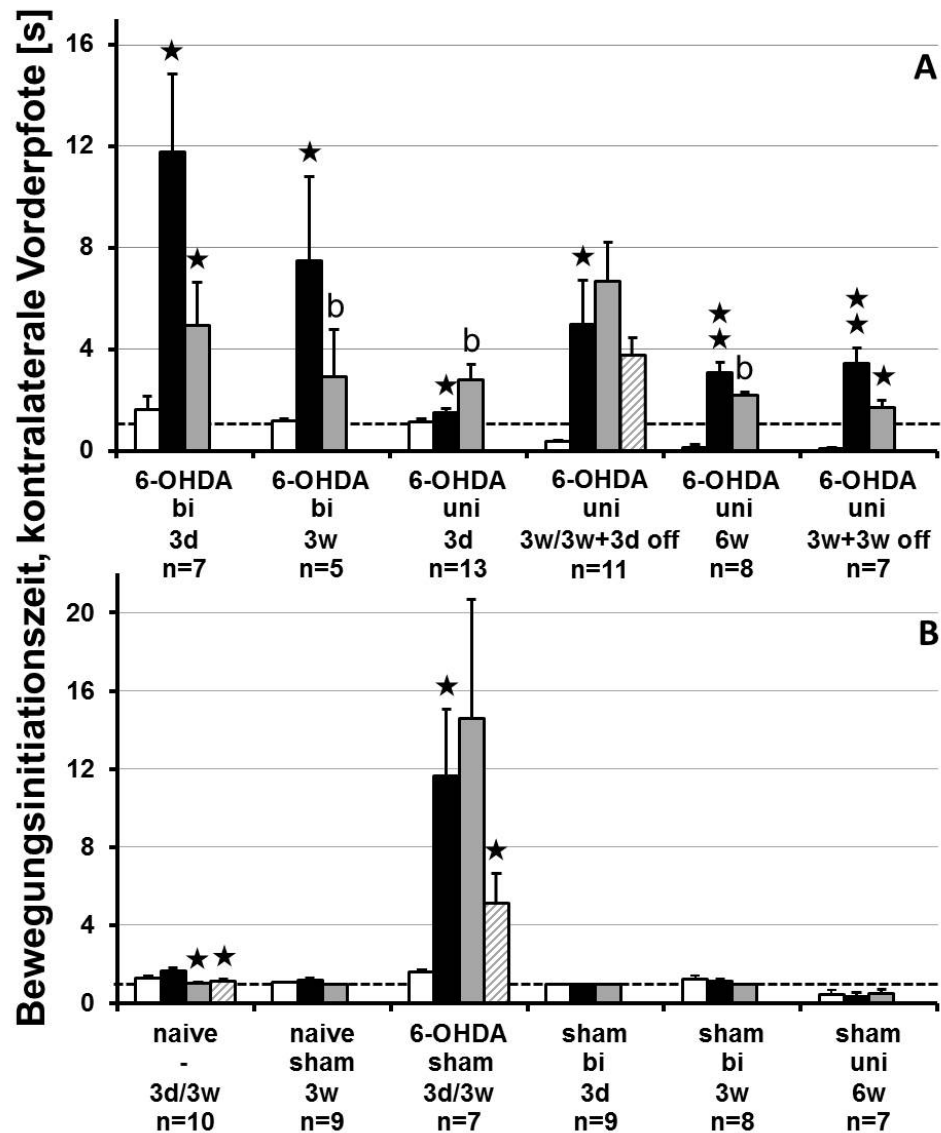


Abb. 36: Stepping-Test, Prüfung der Bewegungsinitiationszeit der kontralateralen Vorderpfote

Kurz- und langzeitige THS-Effekte uni- und bipolarer Elektroden auf die Bewegungsinitiationszeiten der kontralateralen Vorderpfoten im Stepping-Test. (A) und (B) beziehen sich jeweils auf Test- und Kontrollgruppen. Unterschiedliche Säulenmuster repräsentieren die Ergebnisse zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten; weiß: vor der 6-OHDA-Läsion; schwarz: ca. 12-14 Tage nach 6-OHDA-Läsion, bzw. nach Schein-Läsion; grau oder gestreift bezieht sich auf die jeweiligen im Diagramm angegebenen Applikationszeiten für THS, bzw. Schein-THS. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Student-t-Test für gepaarte Beobachtungen. ★★(hoch signifikant): $p \leq 0,01$; ★(signifikant): $0,01 < p \leq 0,05$; T(Trend): $0,05 < p \leq 0,08$.

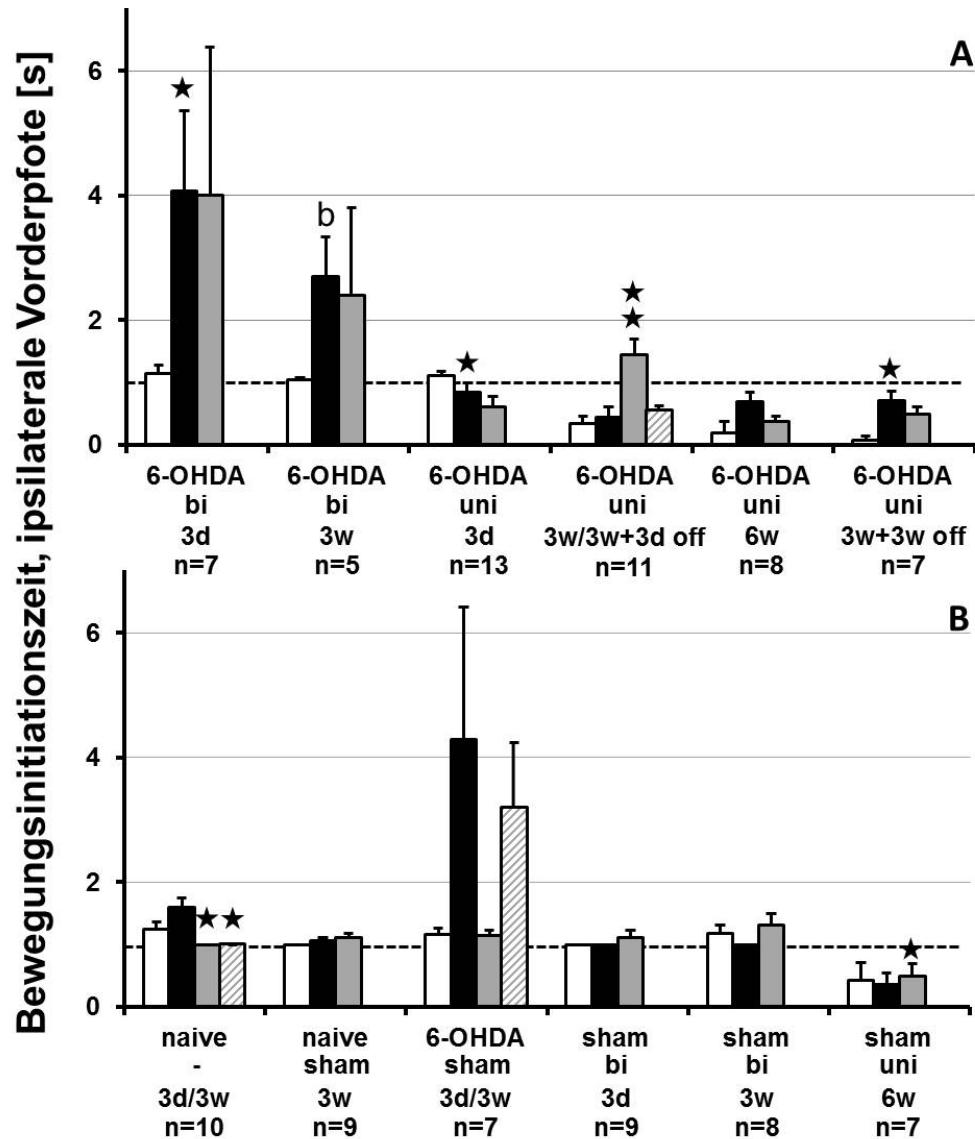


Abb. 37: Stepping-Test, Prüfung der Bewegungsinitiationszeit der ipsilateralen Vorderpfote

Kurz- und langzeitige THS-Effekte uni- und bipolarer Elektroden auf die Bewegungsinitiationszeit der ipsilateralen Vorderpfote im Stepping-Test. (A) und (B) beziehen sich jeweils auf Test- und Kontrollgruppen. Unterschiedliche Säulenmuster repräsentieren die Ergebnisse zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten; weiß: vor der 6-OHDA-Läsion; schwarz: ca. 12-14 Tage nach 6-OHDA-Läsion, bzw. nach Schein-Läsion; grau oder gestreift bezieht sich auf die jeweiligen im Diagramm angegebenen Applikationszeiten für THS, bzw. Schein-THS. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Student-t-Test für gepaarte Beobachtungen. ★★(hoch signifikant): $p \leq 0,01$; ★(signifikant): $0,01 < p \leq 0,05$; T(Trend): $0,05 < p \leq 0,08$.

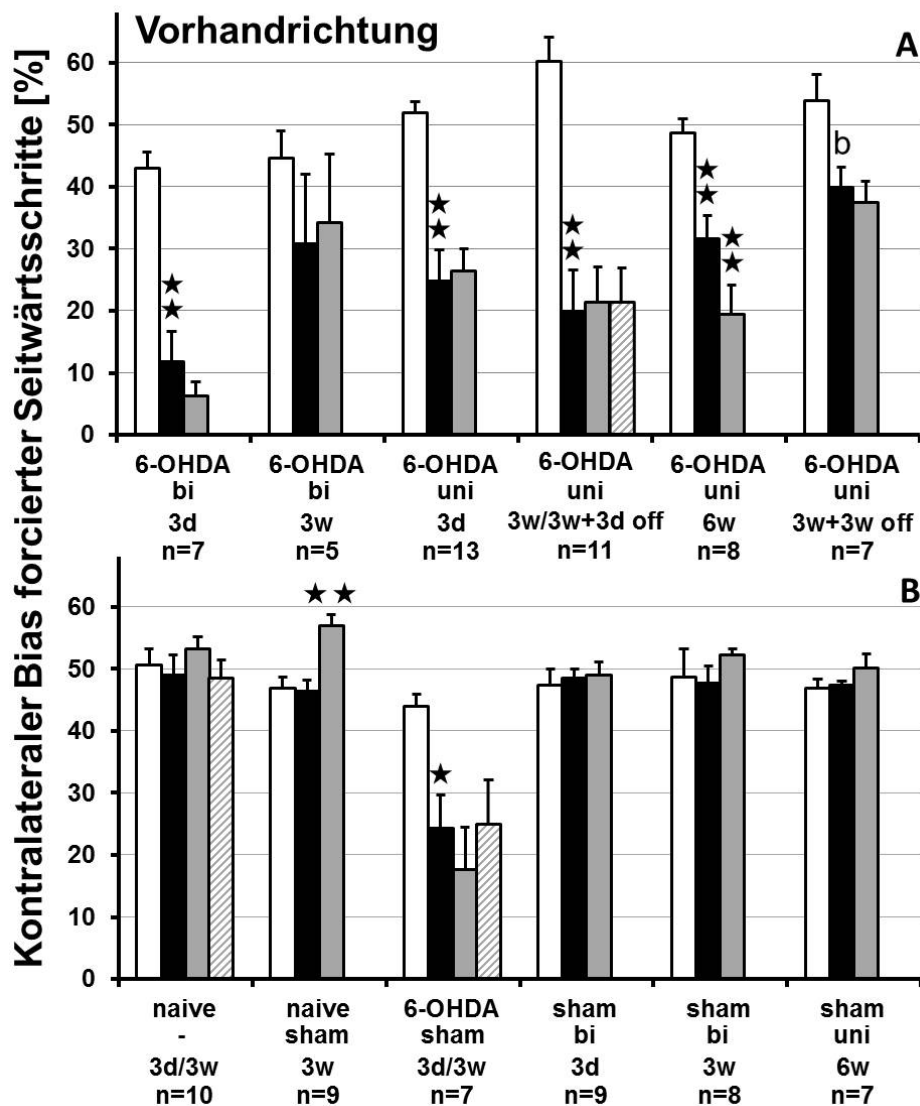


Abb. 38: Stepping- Test, Prüfung der Vorderpfotenbeweglichkeit in Vorhandrichtung

Kurz- und langzeitige THS-Effekte uni- und bipolarer Elektroden auf die 6-OHDA-induzierte Akinesie von Hemiparkinsonratten, gemessen an seitlich forcierten Ausfallschritten beider Vorderpfoten in Vorhandrichtung im Stepping-Test. (A) und (B) beziehen sich jeweils auf Test- und Kontrollgruppen. Unterschiedliche Säulenmuster repräsentieren die Ergebnisse zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten; weiß: vor der 6-OHDA-Läsion; schwarz: ca. 12-14 Tage nach 6-OHDA-Läsion, bzw. nach Schein-Läsion; grau oder gestreift bezieht sich auf die jeweiligen im Diagramm angegebenen Applikationszeiten für THS, bzw. Schein-THS. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Student-t-Test für gepaarte Beobachtungen. ★★ (hoch signifikant): $p \leq 0,01$; ★ (signifikant): $0,01 < p \leq 0,05$; T(Trend): $0,05 < p \leq 0,08$.

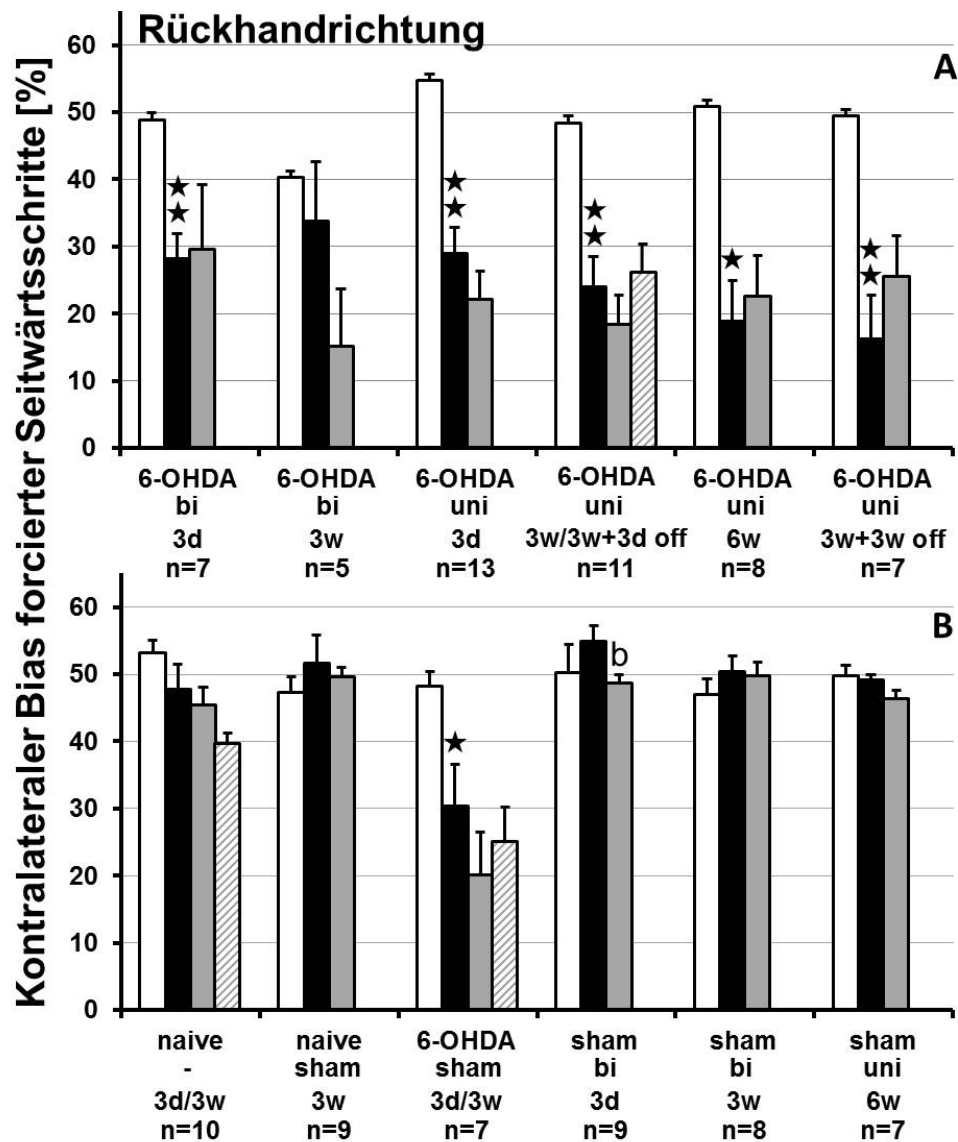


Abb. 39: Stepping- Test, Prüfung der Vorderpfotenbeweglichkeit in Rückhandrichtung

Kurz- und langzeitige THS-Effekte uni- und bipolarer Elektroden auf die 6-OHDA-induzierte Akinesie von Hemiparkinsonratten, gemessen an seitlich forcierten Ausfallschritten beider Vorderpfoten in Rückhandrichtung im Stepping-Test. (A) und (B) beziehen sich jeweils auf Test- und Kontrollgruppen. Unterschiedliche Säulenmuster repräsentieren die Ergebnisse zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten; weiß: vor der 6-OHDA-Läsion; schwarz: ca. 12-14 Tage nach 6-OHDA-Läsion, bzw. nach Schein-Läsion; grau oder gestreift bezieht sich auf die jeweiligen im Diagramm angegebenen Applikationszeiten für THS, bzw. Schein-THS. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Student-t-Test für gepaarte Beobachtungen. ★★(hoch signifikant): $p \leq 0,01$; ★(signifikant): $0,01 < p \leq 0,05$; T(Trend): $0,05 < p \leq 0,08$.

3.4.4. Sensomotorischer Neglect

Wie in Abb. 40 gezeigt, verbesserte die THS den sensomotorischen Neglect von Hemiparkinsonratten nach 3 Wochen mit unipolaren Elektroden im Korridor-Test. Der Effekt konnte auch dann noch signifikant nachgewiesen werden, als die THS für 3 Wochen im Anschluss an eine 3-wöchige THS ausgesetzt wurde. Interessanterweise zeigten weder die kontinuierliche 6-Wochenbehandlung mit unipolaren Elektroden, noch alle anderen Behandlungen mit bipolaren Elektroden den heilsamen Effekt.

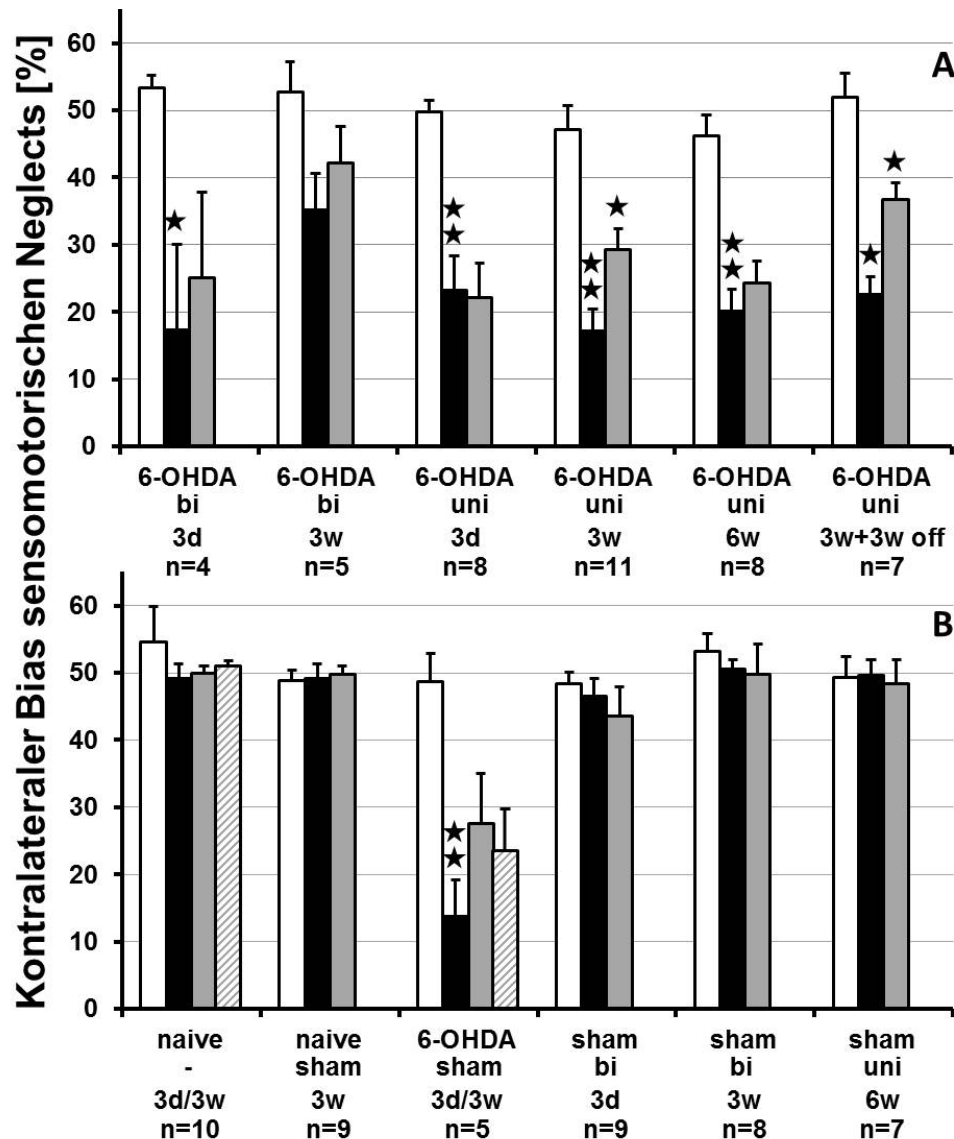


Abb. 40: Korridor-Test

Kurz- und langzeitige THS-Effekte uni- und bipolarer Elektroden auf den sensomotorischen Neglect von Hemiparkinsonratten, gemessen am kontralateralen Bias im Korridor-Test. (A) und (B) beziehen sich jeweils auf Test- und Kontrollgruppen. Unterschiedliche Säulenmuster repräsentieren die Ergebnisse zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten; weiß: vor der 6-OHDA-Läsion; schwarz: ca. 12-14 Tage nach 6-OHDA-Läsion, bzw. nach Schein-Läsion; grau oder gestreift bezieht sich auf die jeweiligen im Diagramm angegebenen Applikationszeiten für THS, bzw. Schein-THS. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Student-t-Test für gepaarte Beobachtungen. ★★(hoch signifikant): $p \leq 0,01$; ★(signifikant): $0,01 < p \leq 0,05$; T(Trend): $0,05 < p \leq 0,08$.

3.4.5. Ängstlichkeit

Der Offenfeld-Test ermöglicht die Beurteilung der lokomotorischen Aktivität und des Angstverhaltens. Während der Parameter „Insgesamt zurückgelegte Wegstrecke“ sowohl von der lokomotorischen Funktion, als auch von der Ängstlichkeit beeinflusst ist, reflektiert das Streckenverhältnis (Zentrum vs. Peripherie) hauptsächlich Ängstlichkeit.

Es kann die allgemeine Aussage getroffen werden, dass naive vollkommen unbehandelte Ratten im Laufe der Zeit ein verringertes Angstverhalten zeigten, wohingegen vor allem Schein-THS-behandelte naive Ratten und THS-behandelte Schein-läsionierte Ratten keine Änderung des Angstverhaltens zeigten (Abb. 42).

Jedoch reduzierte die THS mit unipolaren Elektroden das Angstverhalten, wenn über einen Zeitraum von 3 und 6 Wochen stimuliert wurde. Nach lediglich 3-tägiger THS war im unipolaren Fall keine signifikante Beeinflussung zu messen. Im Gegensatz dazu führte die THS mit bipolaren Elektroden ausschließlich nach 3 Tagen und nicht nach 3 Wochen zu einer signifikanten Reduktion angstähnlichen Angstverhaltens. Nicht signifikant, aber mit einem starken Trend ($p=0,06$) verbesserte sich der Parameter nach 6-wöchiger Schein-THS (Abb. 42).

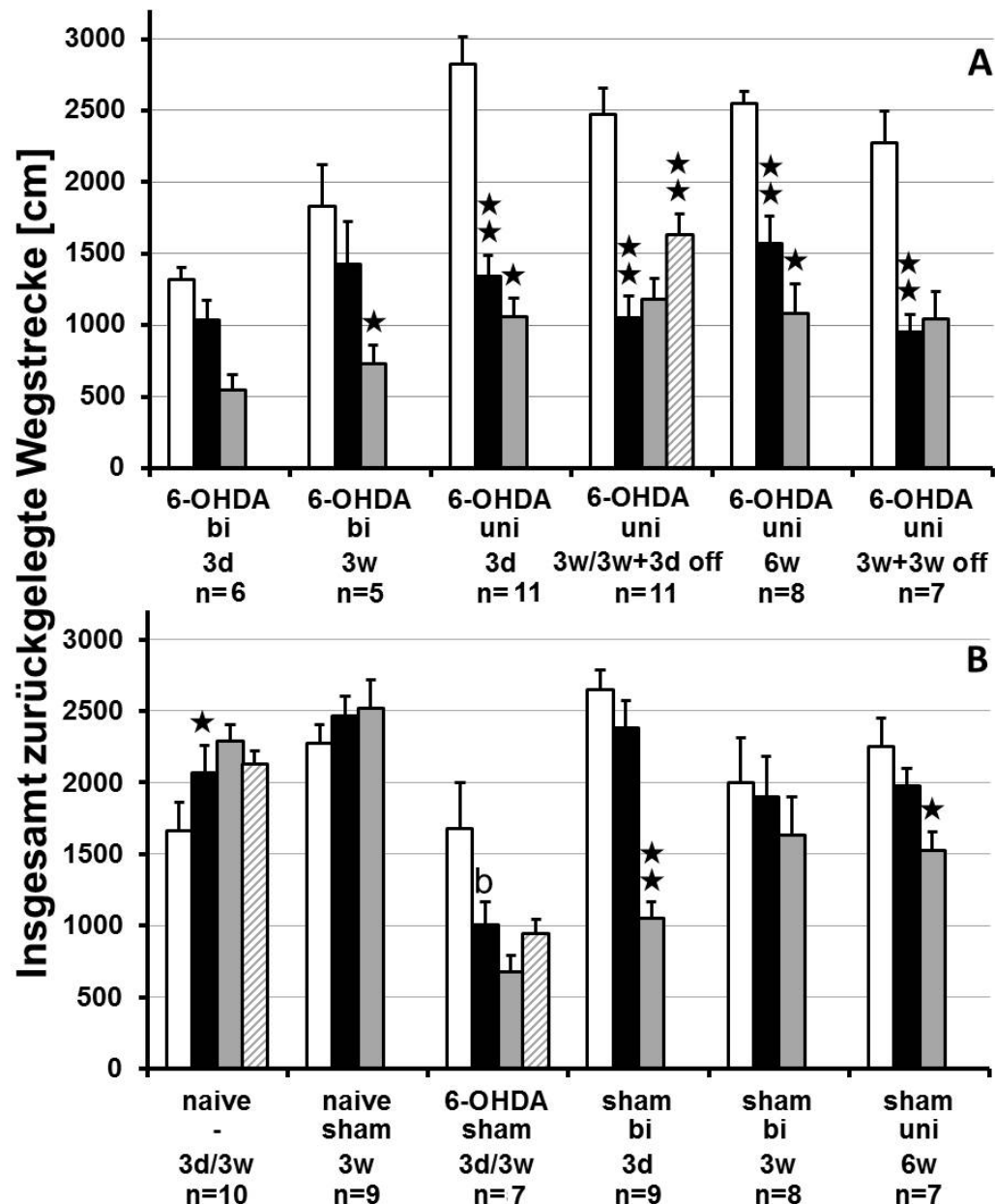


Abb. 41: Offenfeld-Test, Prüfung der lokomotorischen Aktivität

Kurz- und langzeitige THS-Effekte uni- und bipolarer Elektroden auf die lokomotorische Aktivität von Hemiparkinsonratten, gemessen an der „Insgesamt zurückgelegte Wegstrecke“ im Offenfeld-Test. (A) und (B) beziehen sich jeweils auf Test- und Kontrollgruppen. Unterschiedliche Säulenmuster repräsentieren die Ergebnisse zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten; weiß: vor der 6-OHDA-Läsion; schwarz: ca. 12-14 Tage nach 6-OHDA-Läsion, bzw. nach Schein-Läsion; grau oder gestreift bezieht sich auf die jeweiligen im Diagramm angegebenen Applikationszeiten für THS, bzw. Schein-THS. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Student-t-Test für gepaarte Beobachtungen. ★★ (hoch signifikant): $p \leq 0,01$; ★ (signifikant): $0,01 < p \leq 0,05$; T (Trend): $0,05 < p \leq 0,08$.

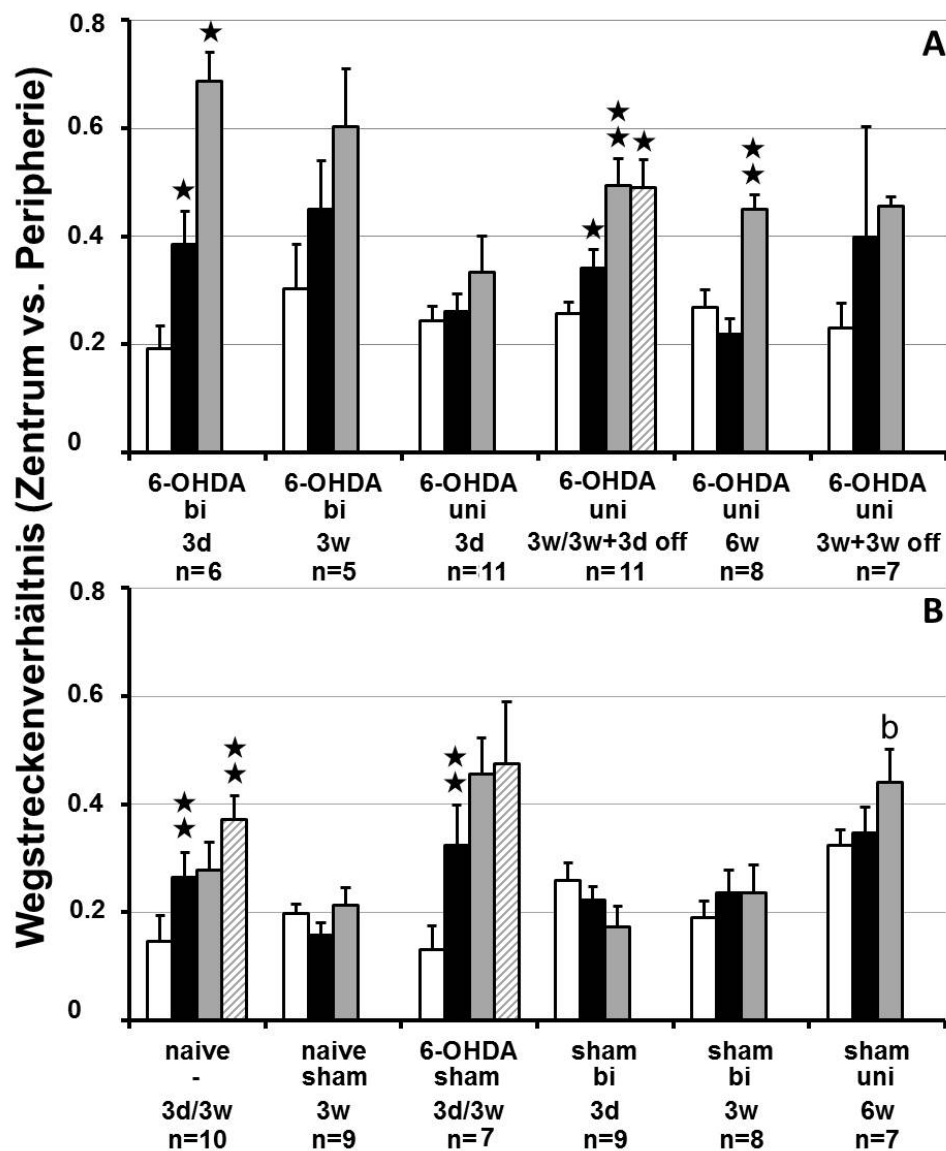


Abb. 42: Offenfeld-Test, Prüfung des Angstverhaltens

Kurz- und langzeitige THS-Effekte uni- und bipolarer Elektroden auf das Angstverhalten von Hemiparkinsonratten, gemessen am „Verhältnis der zurückgelegten Wegstrecke im Zentrum zur Gesamtwegstrecke“ im Offenfeld-Test. (A) und (B) beziehen sich jeweils auf Test- und Kontrollgruppen. Unterschiedliche Säulenmuster repräsentieren die Ergebnisse zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten; weiß: vor der 6-OHDA-Läsion; schwarz: ca. 12-14 Tage nach 6-OHDA-Läsion, bzw. nach Schein-Läsion; grau oder gestreift bezieht sich auf die jeweiligen im Diagramm angegebenen Applikationszeiten für THS, bzw. Schein-THS. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Student-t-Test für gepaarte Beobachtungen. ★★(hoch signifikant): $p \leq 0,01$; ★(signifikant): $0,01 < p \leq 0,05$; T(Trend): $0,05 < p \leq 0,08$.

3.4.6. Zusammenfassung der Ergebnisse der Verhaltenstests

Um die Langzeit-Effekte der THS quantitativ zu beurteilen, wurden der Apomorphin-induzierte Rotationstest, der Stepping-Test, der Korridor-Test und der Offenfeld-Test zu unterschiedlichen Zeitpunkten von bis zu 6 Wochen durchgeführt. Die Tests wurden parallel an gesunden, Schein-läsionierten und Schein-THS-behandelten Tieren durchgeführt. Es wurden insgesamt sieben Parameter bestimmt und miteinander verglichen. Die Ergebnisse der Verhaltenstests aus den Abb. 35 - Abb. 42 sind in Tab. 8 zusammengefasst.

Die lokomotorische Funktion wurde beurteilt anhand der: (i) Apomorphin-induzierten Rotation; (ii) Bewegungsinitiationszeit der kontralateralen Vorderpfote, sowie der Anzahl an forcierten Seitwärtsschritten in (iii) Vor- und (iv) Rückhandrichtung im Stepping-Test; sowie zusätzlich über die (vi) insgesamt zurückgelegte Wegstrecke im Offenfeld-Test. Die Beurteilung des sensomotorischen Neglects und der Ängstlichkeit erfolgte mit der Bestimmung des: (v) kontralateralen Bias im Korridor-Test und des (vii) Verhältnisses der zurückgelegten Strecke im Zentrum zur insgesamt zurückgelegten Strecke im Offenfeld-Test.

Tab. 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der Verhaltenstests

Eine signifikante Verbesserung, bzw. Verschlechterung von THS-induzierten Parkinsonsymptomen ist mit (+) und (-) gekennzeichnet. Die Bezeichnung (b) markiert nicht signifikante Ergebnisse, die jedoch einem starken Trend aufzeigen. Wurden keine signifikanten THS-Effekte verzeichnet ist (0) eingetragen. Die Bezeichnung (n.d.) steht für "nicht definiert", in dem Fall wurde kein entsprechender Test durchgeführt. *Diese Ergebnisse können nicht hinsichtlich der therapeutischen Wirkung von THS interpretiert werden. RT, ST, KT und OFT stehen für Apomorphin-induzierter Rotationstest, Stepping-Test, Korridor-Test und Offenfeld-Test. (i) bis (vii) stehen für die oben aufgelisteten und in den Verhaltenstests geprüften Parameter.

Test (Parameter)	RT (i)	ST (ii)	ST (iii)	ST (iv)	KT (v)	OFT (vi)	OFT (vii)*
6-OHDA_bi_3d	b+	+	0	0	0	0	Up
6-OHDA_bi_3w	b+	b+	0	0	0	-	0
6-OHDA_uni_3d	+	b-	0	0	0	-	0
6-OHDA_uni_3w	+	0	0	0	+	0	Up
6-OHDA_uni_3w+3d off	0	0	0	0	n.d.	+	Up
6-OHDA_uni_6w	0	b+	-	0	0	-	Up
6-OHDA_uni_3w+3w off	0	+	0	0	+	0	0

3.5. Untersuchung der Implantat-Gewebe-Kontaktzone

Abb. 43 zeigt eine REM-Aufnahme der Implantat-Gewebe-Kontaktzone einer 6-wöchig stimulierten Ratte. Deutlich zu erkennen ist die ca. 10 μm breite hellere radiale Randzone um den angeschliffenen Querschnitt der abisolierten Elektroden spitze.

Die EDA-Analyse ergab eine Anreicherung von Osmium in dieser Zone, was auf einen Spalt in der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone hindeutet. Im umliegenden Gewebe wurde jedoch kaum Osmium gefunden, was wiederum darauf schließen lässt, dass die Kontrastierung mit Osmiumtetroxid nicht effizient genug war. Die Elemente Platin und Iridium beschränkten sich erwartungsgemäß auf den Elektrodenquerschnitt, d.h. keines dieser Elemente diffundierte ins Gewebe (Abb. 44).

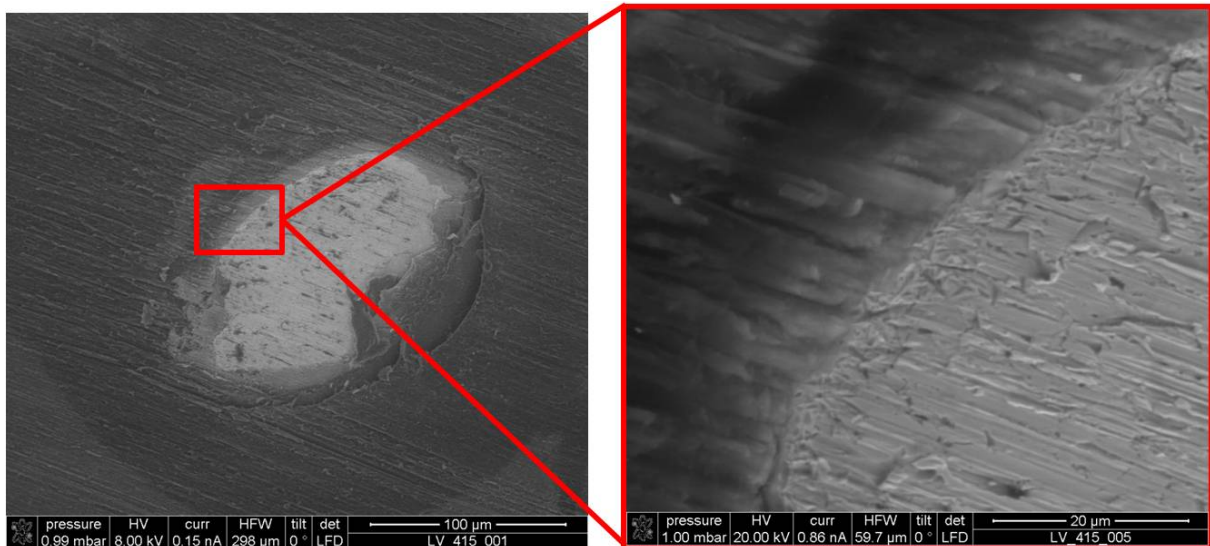


Abb. 43: REM-Aufnahme der Implantat-Gewebe-Kontaktzone

Anschliff der Elektroden spitze einer 6-wöchig stimulierten Ratte. Das in der Kalotte belassene Rattenhirn war zuvor von ventral präpariert, dann in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert, danach mit Osmiumtetroxid kontrastiert und schließlich in kaltaushärtendes Epoxidharz eingebettet worden. Deutlich zu erkennen ist die hellere radiale Randzone. Die EDA-Analyse (Abb. 44) ergab eine Anreicherung von Osmium in dieser Zone, was auf einen Spalt zwischen Elektrode und Gewebe hindeutet. Die REM-Analysen (Quanta 3D 200i, FEI, Eindhoven, Niederlande) erfolgten am Lehrstuhl für Werkstoffe für die Medizintechnik in Warnemünde und wurden gemeinsam mit M. Sc. Ariane Busch durchgeführt.

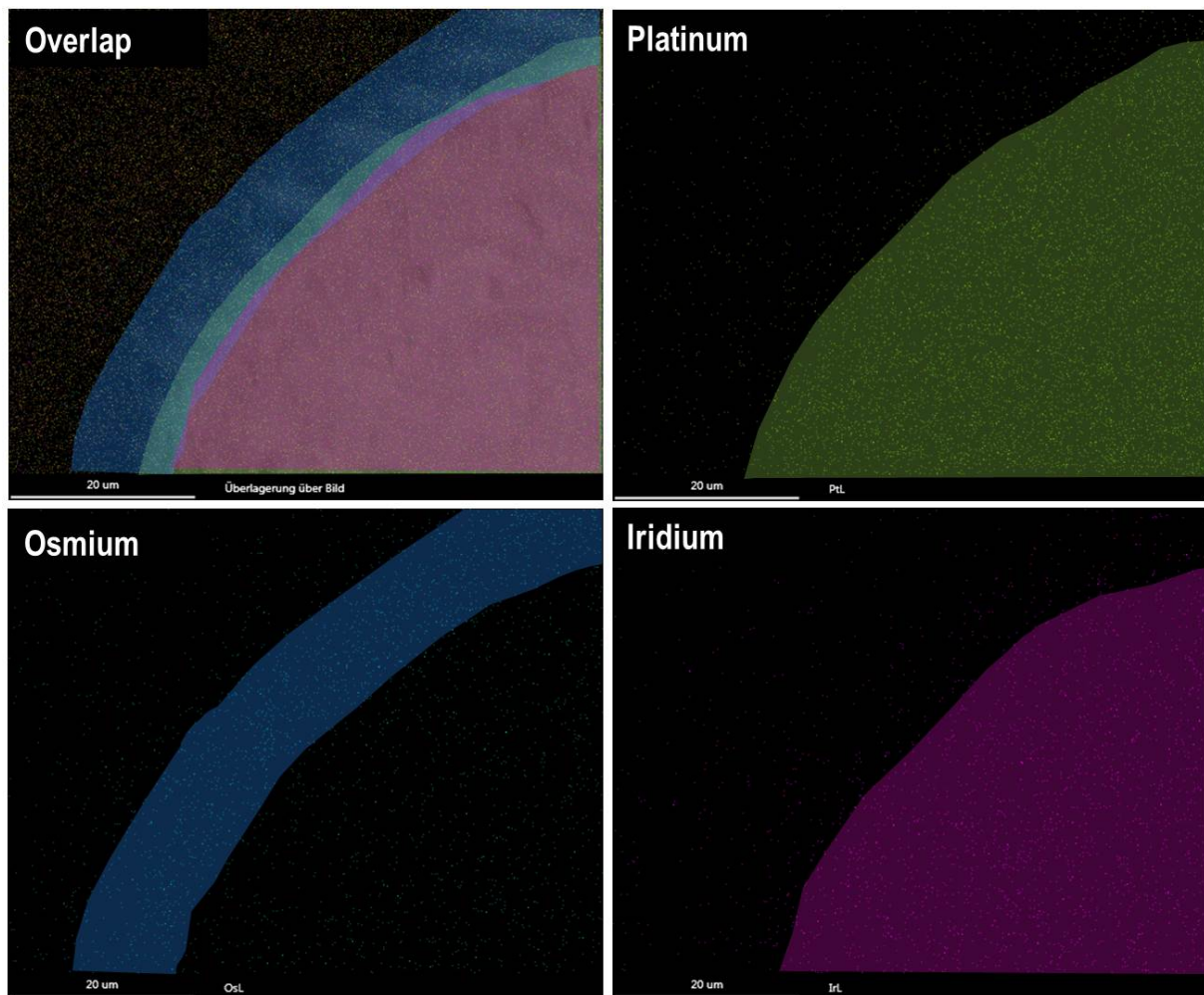


Abb. 44: EDA-Analyse der Implantat-Gewebe-Kontaktzone

EDA-Analyse der in (Abb. 43) gezeigten Elektroden Spitze einer 6-wöchig stimulierten Ratte mit Verteilung der Elemente: Platin (grün), Iridium (rot) und Osmium (blau). Zur deutlicheren Visualisierung sind die Bilder manuell nachkoloriert. Platin und Iridium beschränken sich erwartungsgemäß auf den Elektrodenquerschnitt. Eine starke Anreicherung von Osmium wird im Bereich der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone deutlich. Die EDA-Analysen (Quanta 3D 200i, FEI, Eindhoven, Niederlande) erfolgten am Lehrstuhl für Werkstoffe für die Medizintechnik in Warnemünde und wurden gemeinsam mit M. Sc. Ariane Busch durchgeführt.

4. Diskussion

4.1. Verhaltenstests

Man geht davon aus, dass die motorischen Defizite von Parkinson-Patienten auf Störungen kortikobasaler Regelkreise zurückzuführen sind, die zu pathologischen neuronalen Oszillationen führen [Brazhnik *et al.* 2014]. Die Desynchronisation dieser Oszillationen ist vermutlich der Hauptwirkmechanismus der THS [Wilson *et al.* 2011]. Man nimmt an, dass die THS sowohl hemmende als auch erregende Effekte auf lokaler und systemischer Ebene hat. Neben der Desynchronisation wurden weitere Hypothesen zur Wirkweise von THS vorgeschlagen, die auf der Unterdrückung der anormalen neuronalen Aktivität und kortikobasaler Schleifenverstärkung beruhen [Brock *et al.* 1952,

Dostrovsky *et al.* 2000, Montgomery und Baker 2000, Beurrier *et al.* 2001, Zucker und Regehr 2002, Montgomery und Gale 2008, Santaniello *et al.* 2015]. Trotz dieser intensiven Forschung sind die Mechanismen der THS noch nicht gänzlich verstanden. Daraus leitet sich insbesondere die Forderung nach verbesserten Tiermodellen ab.

Das 6-OHDA-induzierte Hemiparkinson-Modell der Ratte hat sich für die Untersuchung von therapeutischen Ansätzen der Parkinson-Erkrankung etabliert [Meissner *et al.* 2002, Maesawa *et al.* 2004, Fang *et al.* 2006 und 2010, So *et al.* 2012]. In diesem Modell konnte z.B. nachgewiesen werden, dass STN-THS die erhöhten striatalen Glutamat-, Glutamin- und GABA-Spiegel, die durch die Läsion verursacht wurden, senkt [Melon *et al.* 2015]. Dennoch liefern diese speziellen Studien auf zellulärer und molekularer Ebene auch teilweise rätselhafte Ergebnisse. Beispielsweise beschreibt Walker *et al.* [2009] eine THS-induzierte Erniedrigung der extrazellulären Dopaminspiegel im dorsalen Striatum, während He *et al.* [2014] von steigenden extrazellulären striatalen Dopaminkonzentrationen unter Verwendung des gleichen Modells berichtet. Yamamoto *et al.* [2014] zeigt, dass die THS zu einer Erniedrigung von 3-4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) in der striatalen Interstitialflüssigkeit führt. Carcenac *et al.* [2015] beschreibt eine THS-bedingte verstärkte Expression von D1-Dopaminrezeptoren im Striatum, was mit einer Verbesserung der motorischen Symptomatik der Parkinson-Erkrankung in Verbindung gebracht wird. Gleichzeitig reduziert die THS die Anzahl von D2- und D3-Rezeptoren im Nucleus accumbens, was möglicherweise nachteilige Nebenwirkungen wie Apathie zur Folge hat. Die aufgeführten biochemischen Studien wurden unter akuter, bzw. subchronischer STN-THS von bis zu 7 Tagen durchgeführt. Um jedoch einen noch tieferen Einblick in die THS-Mechanismen und ihre langfristigen, bzw. potentiell anhaltenden Effekte zu erhalten, ist eine Kombination solcher Studien sowohl mit mikroskopischen, elektrophysiologischen und bildgebenden Verfahren, als auch langfristigen Bewegungs- und Verhaltenstests notwendig.

Auch wenn das 6-OHDA-Rattenmodell dafür bekannt ist, dass es die wichtigsten Verhaltensstörungen widerspiegelt, die charakteristisch für Patienten mit der Parkinson-Erkrankung sind, unterliegen viele Tierstudien Beschränkungen in Bezug auf die freie Beweglichkeit und/oder durch intensive invasive Chirurgie in Kombination mit kurzen Beobachtungsperioden. Diese reichen von wenigen Minuten [Fang *et al.* 2006 und 2010, So *et al.* 2012, Ryu *et al.* 2013, Dorval und Grill 2014, Dela Cruz *et al.* 2015] bis zu einigen Tagen [Harnack *et al.* 2008, Goff *et al.* 2009, Spieles-Engemann *et al.* 2010, Lortet *et al.* 2013, Melon

et al. 2015]. Neben der vorgestellten chronischen Instrumentierung der vorliegenden Arbeit, werden abnehm- und wiederverwendbare Geräte zur Langzeitstimulation bisher nur von Forni *et al.* [2012] und Ewing *et al.* [2013a und 2013b] beschrieben. Wobei sich die Eigenentwicklung (Abb. 15) insbesondere durch die extrem widerstandsfähige und zuverlässige Art der implantationsseitigen Instrumentierung unterscheidet. Schädelaufbau und Kabel liegen subkutan, sodass das Risiko, dass die Komponenten durch Kratzen, Fellpflege oder Kollision mit diverser Käfigausstattung beschädigt oder gar entfernt werden, sehr niedrig ist. Darüber hinaus wurden ausschließlich biokompatible Materialien verwendet, die sich in einem hervorragenden Wundheilergeschehen widerspiegeln.

In der klinischen Situation wird bevorzugt im unipolaren Stimulationsmodus gearbeitet. So *et al.* [2012] empfiehlt die Verwendung unipolarer THS für zukünftige Medikamenten-induzierte Tests im gleichen Tiermodell mit ähnlichem Set-up, obwohl diese Autoren selbst keinen Unterschied zwischen den Effekten von uni- und bipolarer THS feststellen konnten. In der vorliegenden Studie zeigten sich bei den ersten Experimenten mehr vorteilhafte Effekte unter unipolarer THS als unter bipolarer. Aus diesen Gründen wurden lediglich die Experimente mit unipolaren Elektroden auf eine 6-wöchige Studie erweitert.

Der Frequenzbereich von 90 bis 130 Hz wird im Allgemeinen als optimal für die therapeutische THS bei Parkinson-Patienten erachtet [Ryu *et al.* 2013]. Bei allen Experimenten der vorliegenden Studie wurde mit 130 Hz stimuliert. Dennoch soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass dieser Parameter in weiterführenden Studien im Tiermodell eingehender untersucht werden sollte.

Zur Kontrolle des Läsionserfolges und als initialer Test der lokomotorischen Funktion wurde eine klassische medikamenten-induzierte Rotationsprüfung durchgeführt. Diese ist nur auf unilateral läionierte Tiere anwendbar. Hierbei werden pathologische Rotationen infolge der Gabe des Dopaminagonisten Apomorphin oder des Dopamin-freisetzenden Medikaments Amphetamin gemessen. In Bezug auf die Seite der Läsion führt Apomorphin zu kontralateralen und Amphetamin zu ipsilateralen Rotationen [Ungerstedt *et al.* 1969, Ungerstedt and Arbuthnott 1970, Hefti *et al.* 1980, Da Cunha *et al.* 2008]. Hefti *et al.* [1980] und Da Cunha *et al.* [2008] beschreiben eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der nigro-striatalen Läsion und der Intensität pathologischen Rotationsverhaltens. In der vorliegenden Studie wurde Apomorphin verwendet, da Amphetamin-Rotationen weniger informativ bezüglich der Unterscheidung zwischen verschiedenen Graden

(mild, intermediate, severe) von 6-OHDA-induzierten nigro-striatalen Läsionen sind [Grealish *et al.* 2010]. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit früheren Studien kooperierender Arbeitsgruppen [Antipova *et al.* 2013].

Eine überraschende Feststellung dieser Studie ist, dass pathologische Rotationen sowohl nach 3-tägiger, als auch 3-wöchiger THS mit uni- und bipolaren Elektroden signifikant reduziert werden konnten. Dies ist nicht in Übereinstimmung mit der Theorie. Chang *et al.* [2003] zeigten in einer Studie über Apomorphin-induzierte Rotationen, dass STN-THS keine Wirkung auf das Rotationsverhalten von 6-OHDA-läsionierten Ratten hat. Apomorphin ist ein Dopaminrezeptoragonist. Durch die systemische Gabe wirkt es auf das Striatum beider Hemisphären. Im Gegensatz zu den Dopaminrezeptoren der gesunden Seite reagieren die auf der läsionierten Hemisphäre durch den Entzug von Dopamin hypersensitiv. Das Signal zur Bewegungsinitiation wirkt sich deshalb auf der läsionierten Seite wesentlich stärker aus und es kommt zu kontralateralen Rotationen. STN-THS bewirkt über bisher nicht vollständig geklärte Mechanismen in der Konsequenz eine Verminderung der Hyperaktivität des STN, dadurch wird die GABA-Produktion im GPi sowie der SNr und in der Folge die Hemmung des Thalamus vermindert, was zu einer Normalisierung der Bewegungsinitiation führt, sichtbar z.B. im Stepping-Test. Die Hypersensitivität der Dopamin-Rezeptoren kann STN-THS theoretisch nicht modifizieren [Chang *et al.* 2003]. Die Ergebnisse der 6-Wochen-Studie, die keine Reduktion des pathologischen Rotationsverhaltens zeigten, bestätigen dies.

Eine andere Situation liegt vor, wenn mit Amphetamin gearbeitet wird, da es einem anderen Wirkmechanismus unterliegt: Amphetamin ist ein Dopamin-freisetzendes Medikament und bewirkt eine vermehrte Dopamin-Ausschüttung bei gleichzeitiger Verminderung der Wiederaufnahme. In der Konsequenz wirkt Amphetamin stärker auf die kontralaterale Hemisphäre, die dadurch ein verstärktes Output-Signal vom Thalamus an den Cortex erhält, was zu ipsilateralen Rotationen führt. STN-THS kann diese Asymmetrie verringern, weil sie den Output auf der ipsilateralen Hemisphäre erhöht. Dies bestätigen zahlreiche Arbeiten, die zeigten, dass STN-THS zu reduzierten Amphetamin-induzierten Rotationen führt [Meissner *et al.* 2002, Maesawa *et al.* 2004, Fang *et al.* 2006 und 2010, So *et al.* 2012].

Metz und Whishaw [2002a] zeigten, dass die Intensität von Medikamenten-induzierter Rotation (Apomorphin, L-DOPA und Amphetamin) nicht mit den Messungen aus

motorischen Verhaltenstests (Skilled Reaching Test²⁶ und Ladder Rung Walking Task²⁷) korrelieren. Aus der Unabhängigkeit von Rotationsverhalten und motorischer Performance leiten diese Autoren die Notwendigkeit einer allumfassenden Beurteilung ab und empfehlen beide Arten von Tests durchzuführen. Nur so gelänge die bilaterale Untersuchung von 6-OHDA-induzierten Defiziten bei gleichzeitiger Erforschung potentieller Behandlungsmöglichkeiten von funktionellen Defiziten. Auch andere Autoren sind sich der Limitationen von bestehenden Verhaltenstests bewusst und führen eigene verbesserte Tests ein: z.B. ein automatisiertes Rotarod²⁸ Verfahren zur quantitativen nicht-medikamenteninduzierten Beurteilung der Gesamt-Motordefizite [Rozas *et al.* 1997].

Die zusammenfassenden Ergebnisse der Verhaltenstests dieser Studie (Tab. 8) bestätigen die Aussagen von Metz und Whishaw [2002a].

Kirik *et al.* [1998] zeigten, dass die Bestimmung der Bewegungsinitiationszeit der kontralateralen Vorderpfote zu sensitiveren Ergebnissen führt, als Rotation. Auch eigener Beurteilung nach sind spontane Bewegungstests sensitiver im Vergleich zu Medikamenten-induzierten Rotationstests und haben zudem eine höhere klinische Relevanz.

Der Stepping-Test zeigte klare vorteilhafte THS-Effekte. Auch nach 3-wöchiger Unterbrechung von THS anschließend an eine 3-wöchige permanente Stimulation konnten verbesserte Bewegungsinitiierungszeiten verzeichnet werden (Tab. 8).

Dieses Ergebnis legt persistierende THS-Effekte nahe und impliziert neuroprotektive oder gar neuroregenerative Mechanismen. Maesawa *et al.* [2004] beschrieben als erste einen STN-THS-bezogenen Schutz von dopaminergen Neuronen in der SNpc von 6-OHDA läsierten Hemiparkinsonratten. Später beschreiben Harnack *et al.* [2008] im gleichen Tiermodell eine Bewahrung der dopaminergen nigralen Neurone auf der Läsionsseite durch STN-THS im Vergleich zu Schein-stimulierten und THS-naiven Ratten. Diese Daten liefern Hinweise auf die phänotypische Rettung nigraler dopaminergener Neurone durch längerfristige STN-THS. Spieles-Engemann *et al.* [2011] zeigten eine Erhöhung des Wachstumsfaktors BDNF

²⁶ Der Skilled-Reaching-Test (Pelletgreiftest) dient der Bewertung der Motorik beim Ergreifen von Futterstückchen nach Vergara-Aragon *et al.* [2003].

²⁷ Der Ladder-Rung-Walking-Task (Leitertest) ist ein Test zur Beurteilung angelernter Bewegungsaufgaben und umfasst die Platzierung von Vorder- und Hinterpfoten, Pfotenbeweglichkeit und die Koordination der Gliedmaßen untereinander [Metz und Whishaw 2002b].

²⁸ Im Rotarod-Test wird mittels eines rotierenden Zylinders geprüft, inwieweit sich motorische Koordination und physische Ausdauer verändern.

„Brain-Derived Neurotrophic Factor“ und Wu *et al.* [2012] beobachteten eine verringerte Apoptose im nigro-striatalen System nach STN-THS von 6-OHDA läsierten Ratten.

Shinko *et al.* [2014] beschreiben die Erhaltung dopaminerger Fasern im Striatum und dopaminerger Neuronen in der SNpc mit einem parallel auftretenden Anstieg des „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) nach zervikaler Rückenmarksstimulation im gleichen Rattenmodell. Toda *et al.* [2008] zeigten, dass THS sogar zu neuroregenerativen Prozessen führen kann. Diese Autoren fanden, dass die elektrische Stimulation des vorderen Thalamuskerns zu einer verstärkten Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus führt.

Es ist denkbar, dass eine oder mehrere dieser neuroprotektiven oder neuroregenerativen Prozesse eine Rolle in der persistierenden Wirkung von THS-Effekten auf die lokomotorische Aktivität spielen. Persistierende Wirkungen zeigten der Stepping-Test (Bewegungsinitiationszeit der kontralateralen Vorderpfote), der Korridor-Test und der Offenfeld-Test (insgesamt zurückgelegte Wegstrecke). Der Rotationstest und der Test des Angstverhaltens im Offenfeld-Test ergaben keine derartigen Effekte.

Brown *et al.* [2011] zeigten mithilfe der im Offenfeld-Test detektierten Effekte, dass akute STN-THS in der Lage ist, Motordefizite zu verbessern und motorische Repräsentationen wieder herzustellen. Letztere könnten sich im Laufe der chronischen THS ändern. Daher sollten die Ergebnisse des Offenfeld-Tests bei der Beurteilung der Lokomotion nicht überbewertet werden, da sie von verschiedenen modifizierenden Faktoren beeinflusst werden. Diese sind: (i) Gewöhnung (Habituation), (ii) Erkundungsverhalten und (iii) Ängstlichkeit.

Der Korridor-Test wurde ursprünglich entwickelt, um die seitenbezogene, sensomotorische Integration zu untersuchen [Grealish *et al.* 2010]. Darüber hinaus wurde dieser Test auch erfolgreich angewendet, um die Eignung des CM-Pf Komplexes²⁹ als neues Zielgebiet für THS in 6-OHDA läsierten Ratten zu studieren [Goff *et al.* 2009, Jouve *et al.* 2010]. In der vorliegenden Arbeit konnte im Korridor-Test festgestellt werden, dass 3-wöchige STN-THS mit unipolaren Elektroden den sensomotorischen Neglect reduzierte. Dieser Effekt wirkte persistierend, da er auch 3 Wochen nach Abschaltung von THS noch nachweisbar war (Abb. 40). Im Gegensatz dazu zeigen sich nach 6-wöchiger kontinuierlicher Stimulation keine vorteilhaften Effekte. Möglicherweise sind diese Erkenntnisse mit der

²⁹ Der thalamische CM-Pf Komplex besteht aus den beiden Kernen Centrum medianum und Nucleus parafascicularis.

klinischen Situation vergleichbar: initial starke Effekte verschwinden angesichts nicht nachgeregelter Stimulationsparameter. Diese Erkenntnisse werfen die Frage auf, ob den beobachteten Effekten bei akuter und chronischer THS sowie den persistierenden Effekten auf die lokomotorischen und sensomotorischen Funktionen unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen könnten.

Angststörungen bei Parkinson-Patienten rühren nicht nur von der Beeinträchtigung der motorischen Funktion, sondern sind vermutlich auch direkt mit der Dysfunktion des STN verknüpft. Experimente mit bilateral STN-läsionierten Ratten im „Elevated plus-maze“³⁰ legen diese Vermutung nahe [Reymann *et al.* 2013]. Im Rahmen dieser Arbeit, wurde das Angstverhalten im Offenfeld-Test mit dem Parameter „Verhältnis der zurückgelegten Strecke im Zentrum zur insgesamt zurückgelegten Strecke“ bewertet. Mit diesem Parameter wird die Balance, zwischen dem natürlichen Erkundungsverhalten und der Vorsicht der Tiere die ungeschützte Mitte des hell erleuchteten Zentrums des Offenfeldes zu meiden, quantifiziert. Die vorliegende Studie zeigte, dass naive Ratten aufgrund des Gewöhnungseffektes im Laufe der Zeit neugieriger wurden und ein reduziertes Angstverhalten zeigten. Ebenso wie in naiven Ratten nach wiederholter Exposition, konnte auch bei 6-OHDA-läsionierten Tieren eine Verminderung des Angstverhaltens gemessen werden. THS verstärkt diesen Effekt zusätzlich, so dass man nicht von einer Verbesserung im eigentlichen Sinne sprechen kann. Aus diesem Grund können diese Ergebnisse nicht hinsichtlich ihrer therapeutischen Wirkung von THS interpretiert werden. Im Gegensatz dazu hielt sich die Ängstlichkeit Schein-läsionierter und Schein-THS behandelter Ratten, d.h. Ratten deren implantierte Elektroden nicht mit dem Stimulator verbunden waren, auf dem Ausgangsniveau. Ein Grund dafür ist, dass die Ratten weniger aktiv waren als vor der Elektrodenimplantation. Dies könnte bedeuten, dass die Operationen in diesem Fall eine nachteilige Auswirkung hatten und es zu einer behandlungsbedingten Verschlechterung des allgemeinen Gesundheitszustandes der Ratten kam und sie nicht ihr gesundes Verhalten zeigten. Die Beurteilung der lokomotorischen Funktion, gemessen am Parameter „insgesamt zurückgelegte Wegstrecke“ im Offenfeld-Test zeigte, dass ausschließlich unipolare, 3-wöchige THS zu einer Verbesserung der Bewegungsaktivität führte. In allen anderen Fällen war entweder keine Veränderung

³⁰ Das Elevated plus-maze ist ein Test zur Beurteilung von Angst. Ursprünglich wurde er von Pellow et al. [1985] eingeführt, um pharmakologische Studien durchzuführen.

messbar oder der Parameter reduzierte sich signifikant. Dies deutet darauf hin, dass das Wohlbefinden der Ratten in diesem Fall durch THS beeinträchtigt war.

4.2. EIS-Messung

Als mögliche Erklärung für „nicht-gezeigte THS-Effekte“ könnte eine sich ausprägende Unempfindlichkeit gegen THS in Frage kommen. Im bisher verwendeten Modell können Stimulationsparameter durch die fehlende Nachregelung nicht ausgeglichen werden. In der klinischen Praxis ist dies jedoch üblich, um die steigende Impedanz in Folge der Bildung eines Adventitiagewebes an der Elektroden-Gewebe-Grenzfläche elektronisch zu kompensieren. Um den Einwachsprozess der verwendeten Elektroden zu untersuchen wurden eigene Versuchsreihen durchführt. Um die Elektroden *in-vivo* zu untersuchen wurde auf die bewährte, zerstörungsfreie Messmethode EIS zurückgegriffen.

Jedoch ist die Analyse und Interpretation von EIS-Rohdaten, die typischerweise in der komplexen Darstellung (Imaginärteil über Realteil) aufgetragen werden sehr kompliziert. Dies gilt insbesondere bei Messungen, die Ergebnisse von bis zu 6 Wochen darstellen sollen.

Aus diesem Grund wurde eine Methode³¹ entwickelt, die es erlaubt einen aussagekräftigen Parameter (die spezifische elektrische Leitfähigkeit oder Resistivität) im zeitlichen Verlauf darzustellen, der es erlaubt das Einwachsverhalten zu charakterisieren. Die Abbildungen Abb. 32 - Abb. 34 stellen die Veränderungen der Resistivität des Adventitiagewebes implantierter Elektroden im Rattenhirn als sogenannte „Einwachskurven“ dar.

Die „Einwachskurven“ sind gekennzeichnet durch einen charakteristischen Abfall der Resistivität am 2. Messtag. Als mögliche Erklärung dafür könnte eintretendes Wundwasser in Frage kommen, dass sich in der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone sammelt. Ab dem 2. Messtag steigt die Resistivität wieder kontinuierlich an bis die THS am 8. Messtag angeschaltet wird. THS bewirkt offensichtlich, dass es zu einem erneuten Abfall bis auf ungefähr den Anfangswert kommt. Ab einem bestimmten Zeitpunkt (ca. Tag 12) steigt die Resistivität dann wieder an, um sich vermutlich auf einem Plateau einzupendeln. Bipolare Elektroden bilden diesen Verlauf sensitiver ab als unipolare Elektroden.

Eine sich ausbildende Bindegewebshülle (Adventitia) wird als Grund für die Impedanzänderungen angenommen. Lempka *et al.* [2009] zeigten dieses Verhalten für eine

³¹ In Diskussion mit Herrn Prof. Gimsa vom Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock erarbeitet.

einzelne THS-Elektrode in einem Rhesus-Makaken. Für Cochlear Elektroden ist dieses Verhalten jedoch ebenfalls bekannt [Duan *et al.* 2004, Williams *et al.* 2007, Newbold *et al.* 2014]. Die Adventitia formt sich in Folge einer Fremdkörperreaktion [Wintermantel und Ha 2008]. Diese ist abhängig vom Material, so dass das Material selbst einen Einfluss auf die Effektivität von THS hat. Typischerweise stabilisiert sich die Fremdkörperreaktion von Pt/Ir-Elektroden im Rattenhirn und damit die Elektrodenimpedanz nach einigen Wochen [Grill und Mortimer 1994]. Dennoch kann diese Stabilität durch THS beeinflusst werden [Otto *et al.* 2006] was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen. Für Cochlear-Elektroden gilt dies ebenso [Charlet de Sauvage *et al.* 1997, Newbold *et al.* 2004]. Für eine optimale Einstellung des THS-Signals muss die Kinetik der Elektrodenimpedanz aufgrund der sich bildenden Bindegewebshülle in Betracht gezogen werden [Lempka *et al.* 2011].

Frühere Untersuchungen mit kommerziellen Elektroden aus rostfreiem Edelstahl zeigten, dass diese aufgrund der sich negativ auf das Gewebe auswirkenden elektrolytischen Elektrodenprozesse vermieden werden sollten [Gimsa *et al.* 2005, Gimsa *et al.* 2006]. Elektrochemisch-induzierte Veränderungen sind für Pt/Ir-Elektroden vernachlässigbar und wurden deshalb im vorliegenden Modell verwendet.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Nach aktuellem Kenntnisstand präsentiert die vorliegende Arbeit erstmals langfristige Verhaltensuntersuchungen in einem Rattenmodell mit chronischer Instrumentierung von bis zu 6 Wochen. Die Langzeit-Instrumentierung erlaubt eine Adaptation der Ratten an die Komponenten und die Durchführung vergleichender Verhaltenstests zu unterschiedlichen Zeitpunkten unter akuter und chronischer THS, sowie nach Aussetzung der THS. Es konnte gezeigt werden, dass unipolare Stimulation – wie sie auch in der klinischen Praxis angewandt wird – effizienter als bipolare ist. Es zeigten sich mehrere vorteilhafte, teilweise persistierende Langzeit-THS-Effekte, die mindestens 3 Wochen nach Beendigung von 3-wöchiger THS noch nachweisbar waren. Von den verwendeten Verhaltenstests waren der Stepping-Test und der Korridor-Test am besten geeignet, um loko- und sensomotorische Verbesserungen zu beurteilen. Im Gegensatz dazu zeigte die Apomorphin-induzierte Rotation keine Verbesserung nach 6 Wochen. Dies kann als Hinweis auf eine fehlende Regeneration der verletzten neuronalen Strukturen oder eine Regeneration der Strukturen ohne dopaminerge Neuronen betrachtet werden, denn die Hypersensitivität der Dopamin-

Schlussfolgerung und Ausblick

Rezeptoren kann STN-THS nicht modifizieren. Dies macht den Rotationstest geeignet, den Erfolg der 6-OHDA-Läsion nicht aber den Therapieerfolg von STN-THS zu beurteilen. Bei der Interpretation des Angstverhaltens müssen sich Experimentatoren bewusst sein, dass zum einen Gewöhnungseffekte zwischen Versuchswiederholungen auftreten und zum anderen die 6-OHDA-Läsion ebenfalls das Angstverhalten reduziert, was durch THS noch verstärkt wird. Dadurch kommt es zu einer Verfälschung der Testergebnisse.

In Zukunft soll die Reduzierung der Stimulatorgröße zu einer weiteren Verbesserung des Tierschutzes beitragen und die Untersuchung der Wirkung von THS auch in anderen Tiermodellen, wie des Hamsters oder der Maus erlauben. Weiterhin soll die Untersuchung der Wirkungen verbesserter Elektrodengeometrien, sowie Materialien und Oberflächenstrukturen auf die Bewegungsfunktionen und das Verhalten der Tiere vorangetrieben werden. Auch verschiedene elektrische Parameter, wie Stimulationsfrequenz, Signalform und die Vor- bzw. Nachteile Spannungs-kontrollierter vs. Strom-kontrollierter Stimulation bedürfen weiterführender Untersuchung. Es besteht die Hoffnung, dass bestimmte Hypothesen der THS-Effekte auf pathologische neuronale Oszillationen innerhalb des Basalgangliennetzwerks erfolgreich untersucht, bzw. bestätigt oder widerlegt werden. Das Modell kann als Plattform, für die unabhängige Prüfung einzelner Elemente gesehen werden. Leicht zu bewältigende Modifikationen ermöglichen die Anwendung dieser Plattform auch für die Untersuchung von anderen neurodegenerativen Erkrankungen, bei denen die THS Erfolg verspricht.

Jüngste Forschungsergebnisse bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium der Parkinson-Erkrankung, die unempfindlich gegenüber der üblichen Hochfrequenz-Stimulation wurden, zeigten eine Verbesserung der segmentalen und axialen Symptome, Gangstörungen und Levodopa-induzierten Dyskinesien, nachdem die Stimulationsfrequenz auf 60 Hz reduziert wurde [Ramdhani *et al.* 2015].

Des Weiteren wurden dem bisherigen Kenntnisstand nach zu urteilen keine systematischen allometrischen³² Untersuchungen zur Übertragbarkeit der angewendeten Frequenz beim Menschen auf die viel kleineren Versuchstiere durchgeführt.

Dennoch, ein weiteres bedeutendes Problem ist ungeklärt: auch wenn mit der 6-OHDA Läsion Parkinson-ähnliche Symptome induziert werden, sind langfristige therapeutische THS-Effekte in diesem Modell möglicherweise damit zu erklären, dass sie das Ergebnis der

³² Als Ergebnis der Diskussion mit Prof. Dr. Jan Gimsa vom Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock.

Schlussfolgerung und Ausblick

neuronalen Regeneration in den Gehirnen von jungen Ratten sind. Man könnte vermuten, dass die THS-bezogenen loko- und sensomotorischen Verbesserungen im Stepping- und Korridor-Test ohne gleichzeitig feststellbare Verbesserung des Rotationsverhaltens auf die Aktivierung von neuronalen Ersatzschaltungen hindeuten. Wenn dies gilt, könnten Untersuchungen der Stimulationswirkungen z.B. für die Schlaganfallforschung³³ interessant sein.

Mittelfristig sind in erster Linie die vollständige quantitative Auswertung der histologischen Schnitte, sowie deren Korrelation mit den hier vorgestellten Ergebnissen angedacht.

³³ Als Ergebnis der Diskussion mit Prof. Dr. Jan Gimsa vom Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock.

Zusammenfassung

Die bei der Parkinsonerkrankung klinisch eingesetzte, aber noch nicht vollständig erforschte Behandlungsmethode der Tiefen Hirnstimulation (THS) und bisherige Erkenntnisse aus tierexperimenteller Forschung legen die Vermutung nahe, dass den grundlegenden Mechanismen der THS neuroprotektive oder gar neuroregenerative Wirkweisen zuzuordnen sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob neurotrophe Effekte durch den Langzeiteinsatz von THS-Elektroden am 6-Hydroxydopamin- (6-OHDA-) Hemiparkinsonmodell der Ratte erkennbar werden, die auch nach Abschaltung von THS nachweisbar sind und, inwieweit THS-Elektroden unterschiedlicher Geometrie, Polarität und Feldverteilung auf die Loko- und Sensomotorik, sowie die Emotionalität von Hemiparkinsonratten wirken. Um dieses Ziel umzusetzen wurde eine vergleichende Studie zweier Elektrodenmodifikationen durchgeführt.

Dazu sollten im ersten Schritt die Limitationen vorangegangener THS-Studien am 6-OHDA-Modell der Ratte überwunden werden, um Langzeiteffekte überhaupt erst darstellen zu können. Diese Limitationen ergeben sich aus der Behinderung der Versuchstiere durch die Fixierung an externen Kabelbäumen und/oder beeinträchtigende, invasive Implantate und den daraus resultierenden nicht-repräsentativen Beobachtungszeiträumen.

Aus dem aktuellen Stand der Forschung und Entwicklung leitet sich das Ziel einer Stimulation über 6 Wochen ab. Ausgehend von der durchschnittlichen Lebenserwartung des Menschen (80 Jahre) und der Ratte (3 Jahre) entspricht die 6-wöchige Stimulation im Tierversuch einem Behandlungszeitraum von 3 bis 4 Jahren beim Parkinsonpatienten.

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Han-Ratten verwendet. Die Induktion der Erkrankung erfolgte durch eine invasive Läsion des rechten medialen Vorderhirnbündels (MVB) durch Injektion von 24 µg 6-OHDA. Dadurch wurde bei den Tieren eine einseitige Hemiparkinson-Symptomatik erzeugt, die bei der Testung loko-, und sensomotorischer Funktionen einen Vergleich mit der gesunden Seite erlaubte.

Nach Beurteilung des Läsionsgrades mit dem Apomorphin-induzierten Rotationstest wurden erfolgreich läsionierten Tieren kundenspezifisch gefertigte, eisenfreie, uni- oder bipolare (parallel geführte Drähte mit biphasischer Ansteuerung) Platin/Iridium-Elektroden

in den Nucleus subthalamicus (STN) der läsionierten Seite implantiert und die abgehenden Kabel subkutan in den Nacken verlegt. Eine Woche nach der Implantation wurde die chronische Instrumentierung, bestehend aus einer miniaturisierten Stimulationseinheit, die sich inklusive Batterieversorgung in einem kommerziell beziehbaren Funktionstextil (Weste und Rucksack) befindet, angelegt. Das Modell ermöglicht es Verhaltenstests an vollkommen freilaufenden Ratten bei gleichzeitiger THS durchzuführen. Die Läsionierung und die Implantation der Elektroden erfolgten mittels stereotaktischer Chirurgie. THS erfolgte mit 60 μ s Konstantstimpulsen von 200 μ A bei einer Frequenz von 130 Hz.

Um die Langzeit-Effekte der THS zu beurteilen, wurden geeignete Verhaltenstests zu unterschiedlichen Zeitpunkten von bis zu 6 Wochen durchgeführt. Die Tests wurden parallel an gesunden, Schein-läsionierten und Schein-THS-behandelten Tieren durchgeführt. Hierbei dienten der Apomorphin-induzierte Rotationstest, sowie drei nicht-Medikamenten-induzierte Verhaltenstests (Stepping-, Offenfeld- und Korridor-Test) der quantitativen Beurteilung des Läsions- und THS-Effektes. Dabei wurden insgesamt sieben Parameter bestimmt und miteinander verglichen.

Die lokomotorische Funktion wurde beurteilt mit: (i) Apomorphin-induzierten Rotationen; (ii) der Bewegungsinitiationszeit der kontralateralen Vorderpfote, sowie der Anzahl an forcierten Seitwärtsschritten in (iii) Vor- und (iv) Rückhandrichtung im Stepping-Test; als auch mittels (vi) der zurückgelegten Wegstrecke im Offenfeld-Test.

Die Beurteilung des sensomotorischen Neglects und der Ängstlichkeit erfolgte mit der Bestimmung des: (v) kontralateralen Bias im Korridor-Test und (vii) des Verhältnisses der zurückgelegten Strecke im Zentrum zur insgesamt zurückgelegten Strecke im Offenfeld-Test.

Der Apomorphin-induzierte Rotationstest wurde in erster Linie gewählt, um den Grad der Läsion des Zielgebietes zu bewerten. Literaturangaben zufolge lässt sich dieser so sensitiver beurteilen als mit Amphetamin [Grealish *et al.* 2010]. Anhand des Grades ihrer pathologischen Rotationen erfolgte die Gruppeneinteilung der Versuchstiere (gleiches arithmetisches Mittel). Der Stepping-Test erfasst Änderungen der Fähigkeit zur Bewegungsinitiation der Vorderpfoten. Er wurde ausgewählt, da er ein repräsentatives Modell für zwei der Hauptsymptome der Parkinsonerkrankung darstellt: des Rigors und der Akinesie. Der Offenfeld-Test wurde mit Fokus auf die Beurteilung der Emotionalität (Angst- und exploratives Verhalten) der Ratten ausgewählt. Der Korridor-Test wurde herangezogen, um den sensomotorischen Neglect – eine durch die Läsion hervorgerufene Störung der

Aufmerksamkeit – auf der kontralateralen Seite und dessen THS-bedingte Therapie zu studieren.

Nach den Verhaltenstests wurden die Ratten perfundiert, die Hirne entnommen, zu Kryoprotektionszwecken entwässert und für zukünftige histologische Untersuchungen bei -80°C eingelagert. Exemplarisch erfolgte die Anfertigung von 30 µm Kryostatschnitten für die immunhistochemische Beurteilung mit Färbung der wichtigsten Neurotransmittersysteme (dopaminerg und cholinerg), sowie die beispielhafte Beurteilung Nissl-gefärbter Schnitte der Zielregion (STN) zur retrospektiven Lokalisationskontrolle der Elektroden.

Zur morphologischen Analyse der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone wurde exemplarisch das Hirn eines 6-wöchig stimulierten Tieres nach der Perfusion sorgfältig von ventral präpariert, mit Osmiumtetroxid kontrastiert, in Epoxidharz eingebettet, geschliffen und mittels Rasterelektronenmikroskopie und energiedispersiver Röntgenspektroskopie untersucht.

In einer begleitenden Studie wurde auch das Einwachsverhalten der Elektroden mittels elektrischer Impedanzspektroskopie (EIS) beurteilt. Dabei wurden die Zellkonstanten beider Elektrodenmodifikationen experimentell bestimmt und der spezifische elektrische Widerstand (Resistivität) des die Elektroden umgebenden Mediums errechnet und im Zeitverlauf dargestellt.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und etablierte System der chronischen Instrumentierung ermöglicht die Durchführung von kontinuierlichen THS-Versuchen mit freilaufenden Ratten über einen Zeitraum von bis zu 6 Wochen. Mithilfe des Systems konnten in den Verhaltenstests signifikante Läsions- und Therapieeffekte nachgewiesen werden, dabei zeigten unipolare Elektroden einen insgesamt stärkeren Therapieeffekt als bipolare Elektroden. Aus diesem Grund wurde die abschließende 6-Wochenstudie ausschließlich mit unipolar stimulierten Testgruppen durchgeführt.

Ein überraschendes Ergebnis dieser Studie war, dass pathologische Rotationen sowohl nach 3-tägiger, als auch 3-wöchiger THS mit uni- und bipolaren Elektroden signifikant reduziert werden konnten, wohingegen die Ergebnisse der 6-Wochen-Studie keine Reduktion des pathologischen Rotationsverhaltens zeigten. Letzteres ist in Übereinstimmung mit der Theorie: Apomorphin ist ein Dopaminagonist. Durch die systemische Gabe wirkt es auf das Striatum beider Hemisphären. Im Gegensatz zu den Dopamin-Rezeptoren der gesunden Seite reagieren die Dopamin-Rezeptoren auf der läsionierten Hemisphäre durch

den Entzug von Dopamin hypersensitiv. Das Signal zur Bewegungsinitiation wirkt sich deshalb auf der läsionierten Seite wesentlich stärker aus und es kommt zu einer kontralateralen Rotation. STN-THS bewirkt über bisher nicht vollständig geklärte Mechanismen in der Konsequenz eine Verminderung der Hyperaktivität des STN. Dadurch wird die Gamma-Aminobuttersäure- (GABA-) Produktion im Globus pallidus internus (GPi) und der Substantia nigra pars reticulata (SNr) und in der Folge die Hemmung des Thalamus vermindert, was zu einer Normalisierung der Bewegungsinitiation führt, sichtbar z.B. im Stepping-Test. Die Hypersensitivität der Dopamin-Rezeptoren kann THS nicht modifizieren.

Generell gelten nicht-Medikamenten-induzierte Verhaltenstests als sensibler und klinisch relevanter wie Medikamenten-induzierte Rotationstests. Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst.

Im Stepping-Test wurde eine Verbesserung des Rigors, sowohl unter uni- als auch unter bipolarer THS beobachtet: Unipolare THS zeigte einen starken therapeutischen Effekt in der Testgruppe, die zur näheren Untersuchung des persistierenden Effektes dienen sollte. Dabei erfolgte eine 3-wöchige kontinuierliche THS-Behandlung mit anschließender 3-wöchiger Schein-THS-Behandlung. Bei der ohne Unterbrechung über 6 Wochen stimulierten Vergleichsgruppe war ein deutlicher Trend zur Verbesserung erkennbar. Bipolare Stimulation zeigte bereits nach 3 Tagen einen signifikanten therapeutischen Effekt. Ein ähnlicher Effekt, wenn auch nur mit einem starken Trend, konnte auch nach drei Wochen detektiert werden. Gemessen wurden diese Effekte am Parameter „Bewegungsinitiationszeit der kontralateralen Vorderpfote“.

Der Einsatz unipolarer Elektroden führte auch im Korridor-Test, in Auswertung des sensomotorischen Neglects, zu einer deutlichen Verbesserung. In Analogie zum Stepping-Test konnte der positive therapeutische Effekt in der 6-Wochen-Studie wieder nur in der unterbrochenen Vergleichsgruppe signifikant bestätigt werden.

Im Gegensatz dazu zeigt die Reduktion der „insgesamt zurückgelegte Wegstrecke“ im Offenfeld-Test bei THS- und Schein-THS-behandelten Tieren, dass es zu einer behandlungsbedingten Verschlechterung des allgemeinen Gesundheitszustandes kommen kann. Die Untersuchung der Ängstlichkeit ergab keine klare Aussage, da Gewöhnungseffekte einen verzerrenden Einfluss hatten.

Von den insgesamt sieben untersuchten Parametern eigneten sich nicht alle im gleichen Maße, um therapeutische THS-Effekte gut abbilden zu können. Die Bestimmung des

„kontralateralen Bias“ im Korridortest und die „Bewegungsinitiationszeit der kontralateralen Vorderpfote“ im Stepping-Test wurden dabei als besonders geeignet identifiziert.

Die begleitende Studie zum Einwachsverhalten der Elektroden ergab, dass sich die Resistivität des Gewebes um die Elektrode im Laufe der Zeit auf eine charakteristische und individuelle Art und Weise ändert. Allgemein konnte gezeigt werden, dass die Resistivität am Tag nach Implantation zunächst sinkt. Als mögliche Erklärung wird eine Ansammlung von Wundflüssigkeit vermutet. Danach steigt die Resistivität kontinuierlich bis zu dem Zeitpunkt an, wo die THS angeschaltet wird (Tag 8). THS bewirkt offensichtlich, dass es zu einem erneuten Abfall bis auf ungefähr den Anfangswert kommt. Ab einem bestimmten Zeitpunkt (ca. Tag 12) steigt die Resistivität wieder an, um sich vermutlich auf einem Plateau einzupendeln. Eine sich ausbildende Bindegewebshülle (Adventitia) wird als Grund dafür angenommen. Bipolare Elektroden bilden diesen Verlauf sensibler ab als unipolare Elektroden. Insbesondere die Unstimmigkeit zwischen unterbrochener und kontinuierlicher Stimulation könnte mit zellulären Prozessen an der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone zusammenhängen und sollte mit weiterführenden EIS-Messungen näher untersucht werden. In der klinischen Praxis werden Impedanzänderungen nachgeregelt, diesbezügliche Weiterentwicklungen der Elektronik für das Tiermodell sind ebenfalls wünschenswert.

Die morphologischen Untersuchungen der Grenzschicht zwischen Elektrode und Gewebe einer 6-wöchig stimulierten Ratte zeigten eine ca. 10 µm breite radiale Randzone um den angeschliffenen Querschnitt einer abisolierten, unipolaren Elektrodenspitze. Dies deutet auf einen Spalt in der Implantat-Gewebe-Kontaktzone hin, der eine optimierungsbedürftige Anbindung der Zellen an die Implantatoberfläche impliziert. Hier wären weiterführende Untersuchungen mit neuartigen Elektrodenmaterialien, wie vielversprechende Poly-3,4-ethyldioxythiophen- (PEDOT-) Beschichtungen, interessant.

Die gezeigte Verbesserung der Funktion, insbesondere nach unterbrochener Langzeit-THS, könnte sehr wohl damit erklärt werden, dass neurotrophe Effekte auftreten. Die ausstehende histologische Auswertung der archivierten Hirne, d.h. die Korrelation der histologischen Ergebnisse mit den vorteilhaften Effekten der Verhaltenstests, wird hierzu nähere Informationen liefern.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das vorgestellte Modell der chronischen Instrumentierung zuverlässig ist und eine vielfältig einsetzbare Plattform zum Testen unterschiedlicher Stimulationsparameter, wie zum Beispiel neuartiger Elektroden oder

Danksagung

unerforschter Zielgebiete darstellt. Es stellt Forschergruppen ein Instrument zur Verfügung, dass es ihnen ermöglicht Erprobungsstudien durch Langzeittierversuche zu ergänzen. Die vorgestellte stabile chronische Instrumentierung eignet sich für alle Ratten-Modelle, bei denen die klinische THS Erfolg verspricht. In Zukunft soll die Reduzierung der Stimulatorgröße zu einer weiteren Verbesserung des Tierschutzes beitragen und die Untersuchung der Wirkung von THS auch in anderen Tiermodellen, wie des Hamsters oder der Maus erlauben.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des interdisziplinären DFG Graduiertenkollegs *welisa* 1505/1 der Universität Rostock. Die Arbeiten fanden teils am Lehrstuhl für Biophysik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jan Gimsa und teils an der Klinik und Poliklinik für Neurologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Reiner Benecke statt. Hiermit möchte ich mich für die Vergabe eines sehr interessanten Promotionsthemas an der Schnittstelle Mensch-Technik bedanken.

Zuallererst möchte ich jedoch meine Wertschätzung gegenüber den Parkinson-Patienten zum Ausdruck bringen und hoffe mit dieser Arbeit einen Beitrag zur Erforschung dieser Erkrankung geleistet zu haben.

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Dr. Eilhard Mix für sein altruistisches Engagement in der Betreuung und fachlichen Beratung meiner Arbeiten im Forschungslabor für experimentelle Neurologie und Neurobiologie. Seine stets optimistische und positive Arbeitseinstellung sowie die Fähigkeit den Gemeinschaftssinn der Arbeitsgruppe zu stärken motivierten sehr und trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ulrike Gimsa vom Leibniz-Institut für Nutztierbiologie in Dummerstorf und Herrn Prof. Dr. Jan Gimsa für ihren erheblichen fachlichen Input und fruchtbare Zusammenarbeit bei der Aufarbeitung der wissenschaftlichen Forschungsergebnisse für neue Publikationen.

Viel zu verdanken habe ich meinen lieben Kollegen des Forschungslabors für experimentelle Neurologie und Neurobiologie der Klinik und Poliklinik in Gehlsdorf:

- Selbstredend Herrn Dr. Mix.
- Frau Franziska Alfen, Frau Antje Hufen und Frau Sigrid Neumann, die die Schnittpräparationen und die histologischen Färbungen durchführten und mich

tatkräftig bei der Pflege der Versuchstiere, sowie den Verhaltenstests unterstützten. Besonders Franziska gab mir vor allem bei den vielen Perfusionen seelischen Halt.

- Herrn Dipl.-Biol. Immo Weber, der mich in der ersten Versuchsphase tatkräftig im Rahmen seiner Diplomarbeit unterstützte und insbesondere die Offenfeld-Einrichtung etablierte.

Ich danke den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biophysik:

- Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Jan Gimsa, der stets bereit war Fragestellungen zeitnah zu diskutieren und dafür sensibilisierte Sachverhalte tiefer zu hinterfragen, bzw. in mehrere Richtungen zu denken, was zwar (fast immer) dazu führte, dass Dinge länger dauerten, aber dafür mehr Substanz bekamen.
- Herrn Dipl.-Ing. Thomas Kröger, der den elektronischen Teil der automatischen „Rodent-Rotometer“ entwickelte, mich bei der Messung der Zellkonstanten unterstützte und insbesondere die über Microsoft Office Excel 2007 hinausführende Auswertung der EIS-Daten in Matlab vornahm.
- Herrn Dr. Marco Stubbe für vergleichende numerische Berechnungen der Zellkonstanten.
- Herrn Dr. Carsten Tautorat für viele praktische Tipps bei der Vermessung der Stimulatoren mit dem Oszilloskop.
- Herrn Reik Modrozynski für hervorragende mikroskopische Aufnahmen der Elektroden spitzen.

Ich danke der Sprecherin des DFG Graduiertenkollegs *welisa* Frau Prof. Dr. Ursula van Rienen und den stellvertretenden Sprechern Herrn Prof. Dr. Wolfram Mittelmeier und Herrn Prof. Dr. Jan Gimsa für den Einschluss ins Kolleg und das Privileg in einer so außerordentlich unterstützenden und interdisziplinären Atmosphäre eine Dissertation anfertigen zu dürfen.

Besonderer Dank gilt Frau Petra Gefken. In ihrer Funktion als Koordinatorin des DFG Graduiertenkollegs *welisa* war sie Ansprechpartnerin Nr. 1 in allen Fragen der Organisation und hatte immer ein offenes Ohr.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Detlef Behrend vom Lehrstuhl für Werkstoffe für die Medizintechnik in Warnemünde für die Kooperation bei der Untersuchung der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone und den dort tätigen Mitarbeiterinnen:

- Frau M. Sc. Ariane Busch für die Durchführung der REM- und EDA- Analysen.

Danksagung

- Frau Claudia Winkelmann für die Einbettung meiner Proben in kaltaushärtendes Epoxidharz und die Schlifftechnik.

Involviert in die Untersuchung der Elektroden-Gewebe-Kontaktzone waren ebenfalls:

- Herr Dr. Marcus Frank vom Institut für Pathologie (ELMI, Elektronenmikroskopisches Zentrum).
- Herr Dipl.-Ing. Michael Zwanzig und Herr Dipl.-Phys. Erik Jung vom Fraunhofer Institut für Zuverlässigkeit und Mikrointegration (Standort Berlin) bei denen ich mich ebenfalls recht herzlich bedanken möchte.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Institutes für Anatomie:

- Herrn Prof. Dr. Andreas Wree, der mir die stereotaktischen Operationen vorführte und an dessen Läsionserfolg ich bis heute nicht herangekommen bin.
- Herrn Dr. Alexander Hawlitschka, der mir praktische Tipps bei der Etablierung des Apomorphin-induzierten Rotationstestes gab.
- Frau Susann Lehmann, die mir die Perfusion und Präparation zeigte.

Weiterer Dank gilt:

- Herrn Priv.-Doz. Dr. Frank Böhnke, dem ehemaligen Betreuer meiner Masterarbeit an der TU München für die Bereitstellung von Fachliteratur zur Elektrodenimpedanz.
- Herrn Dr. Robert Arndt für die Entwicklung der miniaturisierten Stimulatorplatinen in Kooperation mit dem Steinbeis-Zentrum STZ 1050 (Rostock).
- Herrn Harald Körmann, dem Leiter der Forschungswerkstatt des Zentrums für Medizinische Forschung der Universität Rostock.

Ich bedanke mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit in Form eines Promotionsstipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs *welisa* 1505/1.

Ganz lieb danke ich meinem Partner Herrn Dipl.-Ing. Christian Meeske, der meine Launen stets wie ein Stein in der Brandung ertrug, mich trotz seines ebenfalls anspruchsvollen beruflichen Pensums enorm in Sachen Kinderbetreuung entlastete sowie Haushaltspflichten übernahm und meiner Schwester Frau Dipl.-Ing. Doreen Badstübner, dem „wandelnden Lexikon“. Und nicht zuletzt gilt mein unendlicher Dank meiner Familie, die mir mit meiner Ausbildung diesen Weg überhaupt erst ermöglichte und mich trotz der Entfernung in jedweder Richtung unterstützte.

Literaturverzeichnis

- Adler, A., Amyot, R., Guardo, R., Bates, J.H., and Berthiaume, Y. (1997). Monitoring changes in lung air and liquid volumes with electrical impedance tomography. *J. Appl. Physiol.* 83, 1762–1767.
- Albin, R.L., Young, A.B., and Penney, J.B. (1995a). The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 18, 63–64.
- Albin, R.L., Young, A.B., and Penney, J.B. (1995b). The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 18, 63–64.
- Alexander, G.E., Crutcher, M.D., and DeLong, M.R. (1990). Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, “prefrontal” and “limbic” functions. *Prog. Brain Res.* 85, 119–146.
- Antipova, V., Hawlitschka, A., Mix, E., Schmitt, O., Dräger, D., Benecke, R., and Wree, A. (2013). Behavioral and structural effects of unilateral intrastriatal injections of botulinum neurotoxin a in the rat model of Parkinson’s disease. *J. Neurosci. Res.* 91, 838–847.
- Asami, K. (2002). Characterization of heterogeneous systems by dielectric spectroscopy. *Prog. Polym. Sci.* 27, 1617–1659.
- Badstübner, K., Kröger, T., Mix, E., Gimsa, U., Benecke, R., and Gimsa, J. (2013). Electrical Impedance Properties of Deep Brain Stimulation Electrodes during Long-Term In-Vivo Stimulation in the Parkinson Model of the Rat. In *Biomedical Engineering Systems and Technologies*, J. Gabriel, J. Schier, S. Van Huffel, E. Conchon, C. Correia, A. Fred, and H. Gamboa, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 287–297.
- Baik, J.H., Picetti, R., Saiardi, A., Thiriet, G., Dierich, A., Depaulis, A., Le Meur, M., and Borrelli, E. (1995). Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 377, 424–428.
- Barreto, G.E., Iarkov, A., and Moran, V.E. (2014). Beneficial effects of nicotine, cotinine and its metabolites as potential agents for Parkinson’s disease. *Front. Aging Neurosci.* 6, 340.
- Barsoukov, E., and Macdonald, J.R. (2005). *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications* (Hoboken, N.J: Wiley-Interscience).
- Bartsch, T. (2007). CME-Fortbildung Neurologie Die tiefe Hirnstimulation jenseits der Parkinsonkrankheit. Wem kann die Elektrode im Hirn helfen? *Info Neurol. Psychiatr.* 9, 36.
- Benabid, A.L., Pollak, P., Louveau, A., Henry, S., and de Rougemont, J. (1987). Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl. Neurophysiol.* 50, 344–346.
- Benabid, A.L., Pollak, P., Gross, C., Hoffmann, D., Benazzouz, A., Gao, D.M., Laurent, A., Gentil, M., and Perret, J. (1994). Acute and long-term effects of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson’s disease. *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 62, 76–84.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., and Seitelberger, F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.* 20, 415–455.

- Beurrier, C., Bioulac, B., Audin, J., and Hammond, C. (2001). High-frequency stimulation produces a transient blockade of voltage-gated currents in subthalamic neurons. *J. Neurophysiol.* *85*, 1351–1356.
- Bisquert, J., Garcia-Belmonte, G., Bueno, P., Longo, E., and Bulhões, L.O.S. (1998). Impedance of constant phase element (CPE)-blocked diffusion in film electrodes. *J. Electroanal. Chem.* *452*, 229–234.
- Bohnen, N.I., and Müller, M.L.T.M. (2013). In vivo neurochemical imaging of olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* *120*, 571–576.
- Brazhnik, E., Novikov, N., McCoy, A.J., Cruz, A.V., and Walters, J.R. (2014). Functional correlates of exaggerated oscillatory activity in basal ganglia output in hemiparkinsonian rats. *Exp. Neurol.* *261*, 563–577.
- Brock, L.G., Coombs, J.S., and Eccles, J.C. (1952). The recording of potentials from motoneurons with an intracellular electrode. *J. Physiol.* *117*, 431–460.
- Brown, A.R., Antle, M.C., Hu, B., and Teskey, G.C. (2011). High frequency stimulation of the subthalamic nucleus acutely rescues motor deficits and neocortical movement representations following 6-hydroxydopamine administration in rats. *Exp. Neurol.* *231*, 82–90.
- Burchiel, K.J., Anderson, V.C., Favre, J., and Hammerstad, J.P. (1999). Comparison of pallidal and subthalamic nucleus deep brain stimulation for advanced Parkinson's disease: results of a randomized, blinded pilot study. *Neurosurgery* *45*, 1375–1382.
- Calleja-Castillo, J.M., De La Cruz-Aguilera, D.L., Manjarrez, J., Velasco-Velázquez, M.A., Morales-Espinoza, G., Moreno-Aguilar, J., Hernández, M.E., Aguirre-Cruz, L., and Pavón, L. (2013). Chronic deep brain stimulation of the hypothalamic nucleus in wistar rats alters circulatory levels of corticosterone and proinflammatory cytokines. *Clin. Dev. Immunol.* *2013*, 698634.
- Carcenac, C., Favier, M., Vachez, Y., Lacombe, E., Carnicella, S., Savasta, M., and Boulet, S. (2015). Subthalamic deep brain stimulation differently alters striatal dopaminergic receptor levels in rats. *Mov. Disord.* doi: 10.1002/mds.26146.
- Carlsson, A., Lindqvist, M., and Magnusson, T. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. *Nature* *180*, 1200–1200.
- Ceballos-Baumann, A.O. (2004). Pathophysiologie der Basalganglien. In *Tiefe Hirnstimulation*, P.D. med J.K. Krauss, and P.-D.D. med J. Volkmann, eds. (Steinkopff), pp. 57–81.
- Chang, J.-Y., Shi, L.-H., Luo, F., and Woodward, D.J. (2003). High frequency stimulation of the subthalamic nucleus improves treadmill locomotion in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res.* *983*, 174–184.
- Charlet de Sauvage, R., Lima da Costa, D., Erre, J.P., and Aran, J.M. (1997). Electrical and physiological changes during short-term and chronic electrical stimulation of the normal cochlea. *Hear. Res.* *110*, 119–134.
- Cheung, T., and Tagliati, M. (2010). Deep brain stimulation: Can we do it better? *Clin. Neurophysiol.* *121*, 1979–1980.
- Chung, K.K., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2001). The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* *24*, S7–S14.

- Collins, K.L., Lehmann, E.M., and Patil, P.G. (2010). Deep brain stimulation for movement disorders. *Neurobiol. Dis.* 38, 338–345.
- Cooperrider, J., Furmaga, H., Plow, E., Park, H.-J., Chen, Z., Kidd, G., Baker, K.B., Gale, J.T., and Machado, A.G. (2014). Chronic deep cerebellar stimulation promotes long-term potentiation, microstructural plasticity, and reorganization of perilesional cortical representation in a rodent model. *J. Neurosci.* 34, 9040–9050.
- Da Cunha, C., Wietzikoski, E.C., Ferro, M.M., Martinez, G.R., Vital, M.A.B.F., Hipólido, D., Tufik, S., and Canteras, N.S. (2008). Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. *Behav. Brain Res.* 189, 364–372.
- Davis, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Caine, E.D., Reichert, C.M., and Kopin, I.J. (1979). Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1, 249–254.
- Defer, G.L., Widner, H., Marié, R.M., Rémy, P., and Levivier, M. (1999). Core assessment program for surgical interventional therapies in Parkinson's disease (CAPSIT-PD). *Mov. Disord.* 14, 572–584.
- DeFries, J.C., Hegmann, J.P., and Weir, M.W. (1966). Open-field behavior in mice: evidence for a major gene effect mediated by the visual system. *Science* 154, 1577–1579.
- Dela Cruz, J. a. D., Heschem, S., Adriaanse, B., Campos, F.L., Steinbusch, H.W.M., Rutten, B.P.F., Temel, Y., and Jahanshahi, A. (2015). Increased number of TH-immunoreactive cells in the ventral tegmental area after deep brain stimulation of the anterior nucleus of the thalamus. *Brain Struct. Funct.* 220, 3061–3066.
- Delden, C. van (2009). Einfluss der chronischen unilateralen Hochfrequenzstimulation des Nucleus subthalamicus auf die neurochemische Transmission im Striatum naiver Ratten. Freie Universität Berlin, Germany.
- DeLong, M.R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13, 281–285.
- Denenberg, V.H. (1969). Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 159, 852–859.
- Dias, V., Junn, E., and Mouradian, M.M. (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J. Park. Dis.* 3, 461–491.
- Dorval, A.D., and Grill, W.M. (2014). Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus reestablishes neuronal information transmission in the 6-OHDA rat model of parkinsonism. *J. Neurophysiol.* 111, 1949–1959.
- Dostrovsky, J.O., Levy, R., Wu, J.P., Hutchison, W.D., Tasker, R.R., and Lozano, A.M. (2000). Microstimulation-induced inhibition of neuronal firing in human globus pallidus. *J. Neurophysiol.* 84, 570–574.
- Doty, R.L., Deems, D.A., and Stellar, S. (1988). Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology* 38, 1237–1244.
- Dowd, E., Monville, C., Torres, E.M., and Dunnett, S.B. (2005). The Corridor Task: a simple test of lateralised response selection sensitive to unilateral dopamine deafferentation and graft-derived dopamine replacement in the striatum. *Brain Res. Bull.* 68, 24–30.

- Duan, Y.Y., Clark, G.M., and Cowan, R.S.C. (2004). A study of intra-cochlear electrodes and tissue interface by electrochemical impedance methods in vivo. *Biomaterials* 25, 3813–3828.
- Dubois, B., Pilon, B., Lhermitte, F., and Agid, Y. (1990). Cholinergic deficiency and frontal dysfunction in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 28, 117–121.
- Eikelis, N., and Van Den Buuse, M. (2000). Cardiovascular responses to open-field stress in rats: sex differences and effects of gonadal hormones. *Stress*. 3, 319–334.
- Ewing, S.G., Porr, B., Riddell, J., Winter, C., and Grace, A.A. (2013a). SaBer DBS: a fully programmable, rechargeable, bilateral, charge-balanced preclinical microstimulator for long-term neural stimulation. *J. Neurosci. Methods*. 213, 228–235.
- Ewing, S.G., Lipski, W.J., Grace, A.A., and Winter, C. (2013b). An inexpensive, charge-balanced rodent deep brain stimulation device: a step-by-step guide to its procurement and construction. *J. Neurosci. Methods*. 219, 324–330.
- Fang, X., Sugiyama, K., Akamine, S., and Namba, H. (2006). Improvements in motor behavioral tests during deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in rats with different degrees of unilateral parkinsonism. *Brain Res.* 1120, 202–210.
- Fang, X., Sugiyama, K., Akamine, S., Sun, W., and Namba, H. (2010). The different performance among motor tasks during the increasing current intensity of deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in rats with different degrees of the unilateral striatal lesion. *Neurosci. Lett.* 480, 64–68.
- Fearnley, J.M., and Lees, A.J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain J. Neurol.* 114, 2283–2301.
- Forni, C., Mainard, O., Melon, C., Goguenheim, D., Kerkerian-Le Goff, L., and Salin, P. (2012). Portable microstimulator for chronic deep brain stimulation in freely moving rats. *J. Neurosci. Methods*. 209, 50–57.
- Forno, L.S. (1996). Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 259–272.
- Foster, K.R., and Schwan, H.P. (1989). Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 17, 25–104.
- Franco-Iborra, S., Vila, M., and Perier, C. (2015). The Parkinson Disease Mitochondrial Hypothesis: Where Are We at? *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry*.
- Fu, S.-P., Wang, J.-F., Xue, W.-J., Liu, H.-M., Liu, B.-R., Zeng, Y.-L., Li, S.-N., Huang, B.-X., Lv, Q.-K., Wang, W., et al. (2015). Anti-inflammatory effects of BHBA in both in vivo and in vitro Parkinsons disease models are mediated by GPR109A-dependent mechanisms. *J. Neuroinflammation* 12, 9.
- Gasser, T. (1998). Genetics of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 44, 53–57.
- Gerfen, C.R. (1995). Dopamine Receptor Function in the Basal Ganglia: *Clin. Neuropharmacol.* 18, 162–177.
- Gerlach, M., Riederer, P., Przuntek, H., and Youdim, M.B. (1991). MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 208, 273–286.

- Gerlach, M., Reichmann, H., Riederer, P., Dietmaier, O., Götz, W., Laux, G., and Storch, A. (2007). *Die Parkinson-Krankheit: Grundlagen, Klinik, Therapie* (Vienna: Springer).
- Gimsa, J., Habel, B., Schreiber, U., van Rienen, U., Strauss, U., and Gimsa, U. (2005). Choosing electrodes for deep brain stimulation experiments - electrochemical considerations. *J. Neurosci. Methods*. *142*, 251–265.
- Gimsa, U., Schreiber, U., Habel, B., Flehr, J., van Rienen, U., and Gimsa, J. (2006). Matching geometry and stimulation parameters of electrodes for deep brain stimulation experiments - numerical considerations. *J. Neurosci. Methods*. *150*, 212–227.
- Glaser, R. (1996). *Biophysik* (Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart).
- Goc, J., Liu, J.Y.W., Sisodiya, S.M., and Thom, M. (2014). A spatiotemporal study of gliosis in relation to depth electrode tracks in drug-resistant epilepsy. *Eur. J. Neurosci*. *39*, 2151–2162.
- Goetz, C.G., Lütge, W., and Tanner, C.M. (1986). Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurology* *36*, 73–75.
- Goff, L.K.-L., Jouve, L., Melon, C., and Salin, P. (2009). Rationale for targeting the thalamic centre-median parafascicular complex in the surgical treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* *15*, 167–170.
- Goldman, D.E. (1943). POTENTIAL, IMPEDANCE, AND RECTIFICATION IN MEMBRANES. *J. Gen. Physiol.* *27*, 37–60.
- Götz, M.E., and Gerlach, M. (2004). Formation of Radicals. In *Brain Damage and Repair*, T. Herdegen, and J. Delgado-García, eds. (Springer Netherlands), pp. 135–164.
- Graeber, M.B., Grasbon-Frodl, E., Abell-Aleff, P., and Kösel, S. (1999). Nigral neurons are likely to die of a mechanism other than classical apoptosis in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* *5*, 187–192.
- Grealish, S., Mattsson, B., Draxler, P., and Björklund, A. (2010). Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci*. *31*, 2266–2278.
- Grill, W.M., and Mortimer, J.T. (1994). Electrical properties of implant encapsulation tissue. *Ann. Biomed. Eng.* *22*, 23–33.
- Gross, R.E., and McDougal, M.E. (2013). Technological Advances in the Surgical Treatment of Movement Disorders. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *13*, 1–12.
- Gubellini, P., Salin, P., Kerkerian-Le Goff, L., and Baunez, C. (2009). Deep brain stimulation in neurological diseases and experimental models: from molecule to complex behavior. *Prog. Neurobiol.* *89*, 79–123.
- Guedel, A.E. (1951). *Inhalation anesthesia* (New York: Macmillan).
- Habel, B. (2004). *Elektrische Stimulation von Zellen und Geweben am besonderen Beispiel von Knochenzellen*. Humboldt-Universität zu Berlin, Germany.
- Haber, S.N. (2003). The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J. Chem. Neuroanat.* *26*, 317–330.

- Haefely, W. (1978). Pharmakologische Modelle zur Wirkung von Antiparkinsonmitteln. In Fischer PA (Hrsg.) *Langzeitbehandlung Des Parkinson-Syndroms*, (Stuttgart, New York: Schattauer), pp. 53–64.
- Hall, C.S., and Ballachey, E.L. (1932). *A Study of the Rat's Behavior in a Field: A Contribution to Method in Comparative Psychology* (University of California Press).
- Hamann, C.H., and Vielstich, W. (2005). *Elektrochemie* (John Wiley & Sons Australia, Limited).
- Harnack, D., Meissner, W., Paulat, R., Hilgenfeld, H., Müller, W.-D., Winter, C., Morgenstern, R., and Kupsch, A. (2008). Continuous high-frequency stimulation in freely moving rats: development of an implantable microstimulation system. *J. Neurosci. Methods*. 167, 278–291.
- He, Z., Jiang, Y., Xu, H., Jiang, H., Jia, W., Sun, P., and Xie, J. (2014). High frequency stimulation of subthalamic nucleus results in behavioral recovery by increasing striatal dopamine release in 6-hydroxydopamine lesioned rat. *Behav. Brain Res.* 263, 108–114.
- Hefti, F., Melamed, E., Sahakian, B.J., and Wurtman, R.J. (1980). Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12, 185–188.
- Hernán, M.A., Takkouche, B., Caamaño-Isorna, F., and Gestal-Otero, J.J. (2002). A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 52, 276–284.
- Hirsch, E.C., and Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 8, 382–397.
- Holthoff, V.A., Vieregge, P., Kessler, J., Pietrzyk, U., Herholz, K., Bönner, J., Wagner, R., Wienhard, K., Pawlik, G., and Heiss, W.D. (1994). Discordant twins with Parkinson's disease: positron emission tomography and early signs of impaired cognitive circuits. *Ann. Neurol.* 36, 176–182.
- Holzmann, C., Dräger, D., Mix, E., Hawlitschka, A., Antipova, V., Benecke, R., and Wree, A. (2012). Effects of intrastriatal botulinum neurotoxin A on the behavior of Wistar rats. *Behav. Brain Res.* 234, 107–116.
- Hornykiewicz, O. (1998). Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology* 51, 2–9.
- Hornykiewicz, O. (2006). The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J. Neural Transm. Suppl.* 9–15.
- Janetzky, B., Hauck, S., Youdim, M.B., Riederer, P., Jellinger, K., Pantucek, F., Zöchling, R., Boissl, K.W., and Reichmann, H. (1994). Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 169, 126–128.
- Jankovic, J., McDermott, M., Carter, J., Gauthier, S., Goetz, C., Golbe, L., Huber, S., Koller, W., Olanow, C., and Shoulson, I. (1990). Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study Group. *Neurology* 40, 1529–1534.
- Jellinger, K.A. (2000). Cell death mechanisms in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 107, 1–29.

- Jenkinson, N., Nandi, D., Muthusamy, K., Ray, N.J., Gregory, R., Stein, J.F., and Aziz, T.Z. (2009). Anatomy, physiology, and pathophysiology of the pedunculopontine nucleus. *Mov. Disord.* *24*, 319–328.
- Jenner, P. (2001). Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* *24*, 245–247.
- Johnsen, E.L., Mogensen, P.H., Sunde, N.A., and Østergaard, K. (2009). Improved asymmetry of gait in Parkinson's disease with DBS: gait and postural instability in Parkinson's disease treated with bilateral deep brain stimulation in the subthalamic nucleus. *Mov. Disord.* *24*, 590–597.
- Jorcin, J.-B., Orazem, M.E., Pébère, N., and Tribollet, B. (2006). CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta.* *51*, 1473–1479.
- Jost, W. (1999). *Autonome Regulationsstörungen beim Parkinson-Syndrom.* (Aachen: Shaker-Verlag).
- Jouve, L., Salin, P., Melon, C., and Kerkerian-Le Goff, L. (2010). Deep brain stimulation of the center median-parafascicular complex of the thalamus has efficient anti-parkinsonian action associated with widespread cellular responses in the basal ganglia network in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* *30*, 9919–9928.
- Kan, K.S., Chao, L.P., and Eng, L.F. (1978). Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in rabbit spinal cord and cerebellum. *Brain Res.* *146*, 221–229.
- Kempf, F., Brücke, C., Salih, F., Trottenberg, T., Kupsch, A., Schneider, G.-H., Doyle Gaynor, L.M.F., Hoffmann, K.-T., Vesper, J., Wöhrle, J., et al. (2009). Gamma activity and reactivity in human thalamic local field potentials. *Eur. J. Neurosci.* *29*, 943–953.
- Kerner, T.E., Paulsen, K.D., Hartov, A., Soho, S.K., and Poplack, S.P. (2002). Electrical impedance spectroscopy of the breast: clinical imaging results in 26 subjects. *IEEE Trans. Med. Imaging* *21*, 638–645.
- Kirik, D., Rosenblad, C., and Björklund, A. (1998). Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastratial 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp. Neurol.* *152*, 259–277.
- Kiss, Z.H.T. (2009). Clinical and experimental aspects of deep brain stimulation. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf. 2009*, 2371–2374.
- Koller, W., Vetere-Overfield, B., Gray, C., Alexander, C., Chin, T., Dolezal, J., Hassanein, R., and Tanner, C. (1990). Environmental risk factors in Parkinson's disease. *Neurology* *40*, 1218–1221.
- Krack, P., Hariz, M.I., Baunez, C., Guridi, J., and Obeso, J.A. (2010). Deep brain stimulation: from neurology to psychiatry? *Trends Neurosci.* *33*, 474–484.
- Krauss, J.K., Volkmann, J., Mundinger, F., and Strupp, A. (2004). *Tiefe Hirnstimulation* (Darmstadt: Steinkopff).
- Kupsch, A., Kühn, A., Klaffke, S., Meissner, W., Harnack, D., Winter, C., Hallett, T.D., Kivi, A., Arnold, G., Eidelberg, K.-M., et al. (2003). Deep brain stimulation in dystonia. *J. Neurol.* *250*, 147–152.
- Lempka, S.F., Miocinovic, S., Johnson, M.D., Vitek, J.L., and McIntyre, C.C. (2009). In vivo impedance spectroscopy of deep brain stimulation electrodes. *J. Neural Eng.* *6*, 046001.

- Lempka, S.F., Johnson, M.D., Moffitt, M.A., Otto, K.J., Kipke, D.R., and McIntyre, C.C. (2011). Theoretical analysis of intracortical microelectrode recordings. *J. Neural Eng.* 8, 045006.
- Lettieri, C., Rinaldo, S., Devigili, G., Pisa, F., Mucchiut, M., Belgrado, E., Mondani, M., D'Auria, S., Ius, T., Skrap, M., et al. (2014). Clinical outcome of deep brain stimulation for dystonia: constant-current or constant-voltage stimulation? A non-randomized study. *Eur. J. Neurol.* 22, 919–926.
- Lev, N., Melamed, E., and Offen, D. (2003). Apoptosis and Parkinson's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 245–250.
- Lewy, F.H. (1913). Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans. *Dtsch Z Nervenheilk* 50, 50–55.
- Lilleeng, B., Gjerstad, M., Baardsen, R., Dalen, I., and Larsen, J.P. (2014). Motor symptoms after deep brain stimulation of the subthalamic nucleus. *Acta Neurol. Scand.* 138, 289–304.
- Lortet, S., Lacombe, E., Boulanger, N., Rihet, P., Nguyen, C., Goff, L.K.-L., and Salin, P. (2013). Striatal molecular signature of subchronic subthalamic nucleus high frequency stimulation in parkinsonian rat. *PLoS One* 8, e60447.
- Macdonald, J.R., and Kenan, W.R. (1987). *Impedance Spectroscopy: Emphasizing Solid Materials and Systems* (New York: Wiley-Interscience).
- Maesawa, S., Kaneoke, Y., Kajita, Y., Usui, N., Misawa, N., Nakayama, A., and Yoshida, J. (2004). Long-term stimulation of the subthalamic nucleus in hemiparkinsonian rats: neuroprotection of dopaminergic neurons. *J. Neurosurg.* 100, 679–687.
- Martignoni, E., Pacchetti, C., Godi, L., Micieli, G., and Nappi, G. (1995). Autonomic disorders in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 45, 11–19.
- McCracken, C.B., and Grace, A.A. (2009). Nucleus accumbens deep brain stimulation produces region-specific alterations in local field potential oscillations and evoked responses in vivo. *J. Neurosci.* 29, 5354–5363.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., Singh, V.K., and Chase, W.H. (1974). Choline acetyltransferase localization in the central nervous system by immunohistochemistry. *Brain Res.* 81, 373–379.
- McIntyre, C.C., Mori, S., Sherman, D.L., Thakor, N.V., and Vitek, J.L. (2004). Electric field and stimulating influence generated by deep brain stimulation of the subthalamic nucleus. *Clin. Neurophysiol.* 115, 589–595.
- Meissner, W., Harnack, D., Paul, G., Reum, T., Sohr, R., Morgenstern, R., and Kupsch, A. (2002). Deep brain stimulation of subthalamic neurons increases striatal dopamine metabolism and induces contralateral circling in freely moving 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neurosci. Lett.* 328, 105–108.
- Melon, C., Chassain, C., Bielicki, G., Renou, J.-P., Kerkerian-Le Goff, L., Salin, P., and Durif, F. (2015a). Progressive brain metabolic changes under deep brain stimulation of subthalamic nucleus in parkinsonian rats. *J. Neurochem.* 132, 703–712.
- Melon, C., Chassain, C., Bielicki, G., Renou, J.-P., Kerkerian-Le Goff, L., Salin, P., and Durif, F. (2015b). Progressive brain metabolic changes under deep brain stimulation of subthalamic nucleus in parkinsonian rats. *J. Neurochem.* 132, 703–712.

- Metz, G.A., and Whishaw, I.Q. (2002a). Drug-induced rotation intensity in unilateral dopamine-depleted rats is not correlated with end point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance. *Neuroscience* *111*, 325–336.
- Metz, G.A., and Whishaw, I.Q. (2002b). Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and coordination. *J. Neurosci. Methods* *115*, 169–179.
- Minnikanti, S., Pereira, M.G.A.G., Jaraiedi, S., Jackson, K., Costa-Neto, C.M., Li, Q., and Peixoto, N. (2010). In vivo electrochemical characterization and inflammatory response of multiwalled carbon nanotube-based electrodes in rat hippocampus. *J. Neural Eng.* *7*, 16002.
- Miocinovic, S., and Grill, W.M. (2004). Sensitivity of temporal excitation properties to the neuronal element activated by extracellular stimulation. *J. Neurosci. Methods* *132*, 91–99.
- Montagnese, C.M., and Csillag, A. (1996). Comparative distribution of NADPH-diaphorase activity and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the diencephalon and mesencephalon of the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Anat. Embryol. (Berl.)* *193*, 427–439.
- Montgomery, E.B., and Baker, K.B. (2000). Mechanisms of deep brain stimulation and future technical developments. *Neurol. Res.* *22*, 259–266.
- Montgomery, E.B., and Gale, J.T. (2008). Mechanisms of action of deep brain stimulation(DBS). *Neurosci. Biobehav. Rev.* *32*, 388–407.
- M. R. Shoar Abouzari, F.B. (2009). On the physical interpretation of constant phase elements. *Solid State Ion.* *180*, 922–927.
- Mutch, W.J., Strudwick, A., Roy, S.K., and Downie, A.W. (1986). Parkinson's disease: disability, review, and management. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed* *293*, 675–677.
- Nambu, A., Tokuno, H., Hamada, I., Kita, H., Imanishi, M., Akazawa, T., Ikeuchi, Y., and Hasegawa, N. (2000). Excitatory cortical inputs to pallidal neurons via the subthalamic nucleus in the monkey. *J. Neurophysiol.* *84*, 289–300.
- Nambu, A., Tokuno, H., and Takada, M. (2002). Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal "hyperdirect" pathway. *Neurosci. Res.* *43*, 111–117.
- Newbold, C., Richardson, R., Huang, C.Q., Milojevic, D., Cowan, R., and Shepherd, R. (2004). An in vitro model for investigating impedance changes with cell growth and electrical stimulation: implications for cochlear implants. *J. Neural Eng.* *1*, 218–227.
- Newbold, C., Mergen, S., Richardson, R., Seligman, P., Millard, R., Cowan, R., and Shepherd, R. (2014). Impedance changes in chronically implanted and stimulated cochlear implant electrodes. *Cochlear Implants Int.* *15*, 191–199.
- Nowak, K., Mix, E., Gimsa, J., Strauss, U., Sriperumbudur, K.K., Benecke, R., and Gimsa, U. (2011). Optimizing a rodent model of Parkinson's disease for exploring the effects and mechanisms of deep brain stimulation. *Park. Dis.* *2011*, 414682.
- Okun, M.S., Gallo, B.V., Mandybur, G., Jagid, J., Foote, K.D., Revilla, F.J., Alterman, R., Jankovic, J., Simpson, R., Junn, F., et al. (2012). Subthalamic deep brain stimulation with a constant-current device in Parkinson's disease: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* *11*, 140–149.

- Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C., and Björklund, A. (1995). Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J. Neurosci.* *15*, 3863–3875.
- Onaral, B., and Schwan, H.P. (1982). Linear and nonlinear properties of platinum electrode polarisation. Part 1: frequency dependence at very low frequencies. *Med. Biol. Eng. Comput.* *20*, 299–306.
- Otto, K.J., Johnson, M.D., and Kipke, D.R. (2006). Voltage pulses change neural interface properties and improve unit recordings with chronically implanted microelectrodes. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* *53*, 333–340.
- Panzica, G.C., Garzino, A., and Garcia Ojeda, E. (1996). Coexistence of NADPH-diaphorase and tyrosine hydroxylase in the mesencephalic catecholaminergic system of the Japanese quail. *J. Chem. Neuroanat.* *11*, 37–47.
- Parent, A., and Hazrati, L.N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res.* *20*, 128–154.
- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Sixth Edition: Hard Cover Edition (Amsterdam; Boston: Academic Press).
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., and Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* *14*, 149–167.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* *276*, 2045–2047.
- Priyadarshi, A., Khuder, S.A., Schaub, E.A., and Priyadarshi, S.S. (2001). Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ. Res.* *86*, 122–127.
- Rajput, A.H., Rozdilsky, B., and Ang, L. (1991). Occurrence of resting tremor in Parkinson's disease. *Neurology* *41*, 1298–1299.
- Ramdhani, R.A., Patel, A., Swope, D., and Kopell, B.H. (2015). Early Use of 60 Hz Frequency Subthalamic Stimulation in Parkinson's Disease: A Case Series and Review. *Neuromodulation J. Int. Neuromodulation Soc.* doi: 10.1111/ner.12288.
- Ranck, J.B. (1975). Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. *Brain Res.* *98*, 417–440.
- Rattay, F. (1999). The basic mechanism for the electrical stimulation of the nervous system. *Neuroscience* *89*, 335–346.
- Reeve, A., Simcox, E., and Turnbull, D. (2014). Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Res. Rev.* *14*, 19–30.
- Reymann, J.-M., Naudet, F., Pihan, M., Saïkali, S., Laviolle, B., and Bentué-Ferrer, D. (2013). Subthalamic nucleus modulates social and anxiogenic-like behaviors. *Behav. Brain Res.* *252*, 356–362.

- Riederer, P., and Wuketich, S. (1976). Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J. Neural Transm.* 38, 277–301.
- Riederer, P., Foley, P., Bringmann, G., Feineis, D., Brückner, R., and Gerlach, M. (2002). Biochemical and pharmacological characterization of 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline: a biologically relevant neurotoxin? *Eur. J. Pharmacol.* 442, 1–16.
- Ries, V., Depboylu, C., Arias-Carrion, O., Oertel, W.H., and Höglinger, G.U. (2008). M. Parkinson - Zukünftige Therapieoptionen aus der Grundlagenforschung. *Neuroforum* 14, 234.
- Rodriguez, M., Morales, I., Rodriguez-Sabate, C., Sanchez, A., Castro, R., Brito, J.M., and Sabate, M. (2014). The degeneration and replacement of dopamine cells in Parkinson's disease: the role of aging. *Front. Neuroanat.* 8, 80.
- Rozas, G., Guerra, M.J., and Labandeira-García, J.L. (1997). An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 2, 75–84.
- Ryu, S.B., Bae, E.K., Kim, J., Hwang, Y.S., Im, C., Chang, J.W., Shin, H.-C., and Kim, K.H. (2013). Neuronal Responses in the Globus Pallidus during Subthalamic Nucleus Electrical Stimulation in Normal and Parkinson's Disease Model Rats. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 17, 299–306.
- Santaniello, S., McCarthy, M.M., Montgomery, E.B., Gale, J.T., Kopell, N., and Sarma, S.V. (2015). Therapeutic mechanisms of high-frequency stimulation in Parkinson's disease and neural restoration via loop-based reinforcement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 586–595.
- Schallert, T., Fleming, S.M., Leasure, J.L., Tillerson, J.L., and Bland, S.T. (2000). CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology.* 39, 777–787.
- Schmidt, C., and van Rienen, U. (2012). Modeling the field distribution in deep brain stimulation: the influence of anisotropy of brain tissue. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 59, 1583–1592.
- Schmidt, W.J., Bubser, M., and Hauber, W. (1992). Behavioural pharmacology of glutamate in the basal ganglia. *J. Neural Transm. Suppl.* 38, 65–89.
- Schrader, C., Benecke, R., Deuschl, G., Hilker, R., Kupsch, A., Lange, M., Sixel-Döring, F., Timmermann, L., Volkmann, J., Fogel, W., et al. (2009). [Deep brain stimulation for dystonia. Consensus recommendations of the German Deep Brain Stimulation Association]. *Nervenarzt* 80, 656–661.
- Schuepbach, W.M.M., Rau, J., Knudsen, K., Volkmann, J., Krack, P., Timmermann, L., Hälbig, T.D., Hesekamp, H., Navarro, S.M., Meier, N., et al. (2013). Neurostimulation for Parkinson's disease with early motor complications. *N. Engl. J. Med.* 368, 610–622.
- Schwartz, R.K., and Huston, J.P. (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog. Neurobiol.* 50, 275–331.
- Shinko, A., Agari, T., Kameda, M., Yasuhara, T., Kondo, A., Tayra, J.T., Sato, K., Sasaki, T., Sasada, S., Takeuchi, H., et al. (2014). Spinal cord stimulation exerts neuroprotective effects against experimental Parkinson's disease. *PloS One* 9, e101468.

- Siegfried, J., and Lippitz, B. (1994). Bilateral chronic electrostimulation of ventroposterolateral pallidum: a new therapeutic approach for alleviating all parkinsonian symptoms. *Neurosurgery* 35, 1126–1129.
- Sixel-Döring, F., Benecke, R., Fogel, W., Hilker, R., Kupsch, A., Lange, M., Schrader, C., Timmermann, L., Volkmann, J., Deuschl, G., et al. (2009). Deep brain stimulation for essential tremor. Consensus recommendations of the German Deep Brain Stimulation Association. *Nervenarzt* 80, 662–665.
- So, R.Q., McConnell, G.C., August, A.T., and Grill, W.M. (2012). Characterizing Effects of Subthalamic Nucleus Deep Brain Stimulation on Methamphetamine-Induced Circling Behavior in Hemiparkinsonian Rats. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng. Publ. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 20, 626–635.
- Sommer, U., Hummel, T., Cormann, K., Mueller, A., Frasnelli, J., Kropp, J., and Reichmann, H. (2004). Detection of presymptomatic Parkinson's disease: combining smell tests, transcranial sonography, and SPECT. *Mov. Disord.* 19, 1196–1202.
- Song, I.-U., Kim, Y.-D., Cho, H.-J., and Chung, S.-W. (2013). Is neuroinflammation involved in the development of dementia in patients with Parkinson's disease? *Intern. Med. Tokyo Jpn.* 52, 1787–1792.
- Spieles-Engemann, A.L., Collier, T.J., and Sortwell, C.E. (2010). A functionally relevant and long-term model of deep brain stimulation of the rat subthalamic nucleus: advantages and considerations. *Eur. J. Neurosci.* 32, 1092–1099.
- Spieles-Engemann, A.L., Steece-Collier, K., Behbehani, M.M., Collier, T.J., Wohlgenant, S.L., Kemp, C.J., Cole-Strauss, A., Levine, N.D., Gombash, S.E., Thompson, V.B., et al. (2011). Subthalamic nucleus stimulation increases brain derived neurotrophic factor in the nigrostriatal system and primary motor cortex. *J. Park. Dis.* 1, 123–136.
- Taylor, J.P., Hardy, J., and Fischbeck, K.H. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296, 1991–1995.
- Temel, Y., Visser-Vandewalle, V., Kaplan, S., Kozan, R., Daemen, M.A.R.C., Blokland, A., Schmitz, C., and Steinbusch, H.W.M. (2006). Protection of nigral cell death by bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Brain Res.* 1120, 100–105.
- Toda, H., Hamani, C., Fawcett, A.P., Hutchison, W.D., and Lozano, A.M. (2008). The regulation of adult rodent hippocampal neurogenesis by deep brain stimulation. *J. Neurosurg.* 108, 132–138.
- Tretiakoff, K.N. (1919). Contribution a l'Etude de L'Anatomie pathologique du Locus Niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et De La Maladie de Parkinson. University of Paris, Frankreich.
- Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5, 107–110.
- Ungerstedt, U., and Arbuthnott, G.W. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 24, 485–493.

- Ungerstedt, U., Butcher, L.L., Butcher, S.G., Ande'n, N.-E., and Fuxe, K. (1969). Direct chemical stimulation of dopaminergic mechanisms in the neostriatum of the rat. *Brain Res.* 14, 461–471.
- Vergara-Aragon, P., Gonzalez, C.L.R., and Wishaw, I.Q. (2003). A novel skilled-reaching impairment in paw supination on the “good” side of the hemi-Parkinson rat improved with rehabilitation. *J. Neurosci.* 23, 579–586.
- Volkman, J. (2009). Finding the best way of stimulating the brain. *Eur. J. Neurol.* 16, 442–443.
- Walker, R.H., Koch, R.J., Moore, C., and Meshul, C.K. (2009). Subthalamic nucleus stimulation and lesioning have distinct state-dependent effects upon striatal dopamine metabolism. *Synap. N. Y.* N 63, 136–146.
- Walsh, R.N., and Cummins, R.A. (1976). The Open-Field Test: a critical review. *Psychol. Bull.* 83, 482–504.
- Warburg, E. (1899). Ueber das Verhalten sogenannter unpolarisierbarer Elektroden gegen Wechselstrom. *Ann. Phys.* 303, 493–499.
- Ward, H.E., Hwynn, N., and Okun, M.S. (2010). Update on deep brain stimulation for neuropsychiatric disorders. *Neurobiol. Dis.* 38, 346–353.
- Weigel, R., Krauss, J.K., and Jones, E.G. (2004). Anatomie und Nomenklatur der Basalganglien und des Thalamus. In *Tiefe Hirnstimulation*, P.D. med J.K. Krauss, and P.-D.D. med J. Volkman, eds. (Steinkopff), pp. 17–56.
- Wermuth, L., and Stenager, E. (1995). Sexual problems in young patients with Parkinson’s disease. *Acta Neurol. Scand.* 91, 453–455.
- Wichmann, T., and DeLong, M.R. (2003). Pathophysiology of Parkinson’s disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 991, 199–213.
- Wilson, C.J., Beverlin, B., and Netoff, T. (2011). Chaotic desynchronization as the therapeutic mechanism of deep brain stimulation. *Front. Syst. Neurosci.* 5, 50.
- Wintermantel, E., and Ha, S.-W. (2008). *Medizintechnik: Life Science Engineering* (Springer).
- Wöhrle, J.C., and Hennerici, M.G. (2004). Morbus Parkinson — Pathophysiologie, Diagnose und medikamentöse Therapie. In *Tiefe Hirnstimulation*, P.D. med J.K. Krauss, and P.-D.D. med J. Volkman, eds. (Steinkopff), pp. 206–228.
- Wree, A., Mix, E., Hawlitschka, A., Antipova, V., Witt, M., Schmitt, O., and Benecke, R. (2011). Intrastriatal botulinum toxin abolishes pathologic rotational behaviour and induces axonal varicosities in the 6-OHDA rat model of Parkinson’s disease. *Neurobiol. Dis.* 41, 291–298.
- Wu, S., Ma, Y., Zhang, K., and Zhang, J. (2012). Effect of deep brain stimulation on substantia nigra neurons in a rat model of Parkinson’s disease. *Chin. Med. J. (Engl.)* 125, 4072–4075.
- Wüllner, U., Kornhuber, J., Weller, M., Schulz, J.B., Löschmann, P.A., Riederer, P., and Klockgether, T. (1999). Cell death and apoptosis regulating proteins in Parkinson’s disease—a cautionary note. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 97, 408–412.

-
- Yamamoto, T., Uchiyama, T., Sakakibara, R., Taniguchi, J., and Kuwabara, S. (2014). The subthalamic activity and striatal monoamine are modulated by subthalamic stimulation. *Neuroscience* 259, 43–52.
- Zucker, R.S., and Regehr, W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 355–405.

Anhang

Anhang

Anhang 1_ Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software

Verbrauchsmaterial/Gerät	Hersteller
Alleinfuttermittel, pelletiert	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D
Alkohol-Tupfer	B. Braun Melsungen AG, D
Ankerschraube, vergoldet (M1,4; L 3,4 mm)	MailShop GmbH Augenoptik, Mühlacker, D
Aufspannvorrichtung HP16047D	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, D
Batterien (3 V) CR 1220 Lithium	AgfaPhoto Holding GmbH, Düren, D
Batterien (12 V) Duracell®	Procter and Gamble Switzerland SARL
Bipolare Pt/Ir-Elektroden	FHC Inc., Bowdoin, USA
Buchse M52-500XX45	Harwin Europe, UK
Camcorder	Sony Deutschland, Berlin, D
Crimphülsen- und Zange	RS Components GmbH, Mörfelden-Walldorf, D
Dentalbohrer	Foredom®, Bethel, USA
Desktop-PC (16GB RAM, Intel Duocore)	Hewlett-Packard, Böblingen, D
Diamantdrahtsäge	well Diamantdrahtsägen GmbH, Mannheim, D
Dieffenbach-Gefäßklemmen (Größe 3,5 cm)	Allgaier Instrumente, Frittlingen/Tuttlingen, D
Exsikkator	VWR international, Darmstadt, D
Firewire-Karte	LogiLink®, Schalksmühle, D
Firewire-Kabel	Hama, Monheim, D
Glühlampe PAR 38 Reflector	Megaman, Langenselbold, D
Golddraht (Ø 0,2 mm)	Goodfellow GmbH, Bad Nauheim, D
Hamilton Mikroliterspritze (5 µl)	Postnova Analytics, Landsberg/Lech, D
Infusionsset, Intrafix®	B. Braun Melsungen AG, D
Injektionskanülen (G 16)	B. Braun Melsungen AG, D
Impedanzspektrometer Sciospec ISX3	Sciospec Scientific Instruments, Pausitz, D
Impedanzspektrometer (4194A Impedance/ Gain-Phase Analyzer)	Hewlett Packard, Palo Alto, USA
Kabel (Einzelader Ø 0,6 mm)	Conrad Electronic SE, Hirschau, D
Korridor-Test-Anordnung	Eigenkonstruktion der Werkstatt des Institutes für Anatomie der Universität Rostock
Kurzzeitwecker, digital	Carl Roth, Karlsruhe, D
Labornetzgerät (Strom- und Spannungsquelle)	Voltcraft, Conrad Electronic AG, Wollerau, CHE
Lanzetten	Carl Roth, Karlsruhe, D
Leitfähigkeitsmessgerät (Seven2Go)	Mettler Toledo GmbH, Gießen, D
Lötstation	WEIDINGER GmbH, Eichenau, D
Lötzinn, bleifrei	Conrad Electronic SE, Hirschau, D
Luxmeter	Carl Roth, Karlsruhe, D
Mikroskop VHX-5000, KEYENCE	KEYENCE Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, D
Mischpistole 10:1 mit dazugehörigen Mischkanülen	M+W Dental Webshop, Büdingen, D
Offenfeld-Polycarbonatbox	Forschungswerkstatt des Zentrums für Medizinische Forschung der Universität Rostock
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Röhrchen mit Schraubverschluss (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Rotlichtlampe	Petra, Burgau, D

Anhang

„Rodent-Rotometer“	Eigenentwicklung des Lehrstuhls für Biophysik
Schermaschine für Tierhaar	Aesculap, Tübingen, D
Schrumpfschlauch, biokompatibel	RS Components GmbH, Mörfelden-Walldorf, D
Skalpell	Bayha®, Tuttlingen, D
Spritzen (1 ml, 5 ml)	B. Braun Melsungen AG, D
Stecker M52-040023V0545 (5-polig)	Harwin Europe, UK
Stereotaktischer Apparat mit Rattenadapter	Stoelting CO. Wood Dale, Illinois, USA
Sucrose Tablets (45 mg), 1811251 5TUT	Test Diet, Richmond, Indiana, USA
THS-Stimulatoren	Rückmann & Arndt, Berlin, D
Tier-Funktionstextil	Lomir Biomedical inc., Malone, USA
Tierwaage	Ohaus, Pine Brook, NJ, USA
Tektronix TDS2014B 4-Kanal Oszilloskop	Tektronix, Inc.
Tracking-Software: Ethovision XT	Noldus Information Technology, Wageningen, NL
Unipolare Pt/Ir-Elektroden	Polyfil, Zug, Schweiz
Wundklammern „Michel Suture Clips“	Harvard Apparatus, Massachusetts, USA

Software	Hersteller
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft
Ethovision XT	Noldus Information Technology
Sciospec-Software für PC-basierte Steuerung	Sciospec Scientific Instruments, Pausitz, D
Matlab (Version 7.9.0.529)	The MathWorks™

Anhang 2_Reagenzien

Reagenz/Chemikalie	Hersteller
2-Komponentenkleber (Luxatemp Plus, 76 g Kartusche)	DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, Hamburg, D
6-OHDA	Sigma®, Deisenhofen, D
Apomorphin	Teclapharm, Lüneburg, D
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Diethyl-Ether	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol 70%	Carl Roth, Karlsruhe, D
Epoxidklebstoff auf Silberbasis (RS 186-3616)	RS Components GmbH, Mörfelden-Walldorf, D
Paraformaldehydlösung (3,7%ig)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kalibrieflüssigkeit (HI77100C)	HANNA instruments
Ketamin-Hydrochlorid, Ketanest S® (25 mg/ml)	Pfizer Deutschland, Berlin, D
Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg, D
Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm®, 500mg/ml)	ratiopharm GmbH, Ulm, D
Osmiumtetroxidlösung	Lösung wurde von Mitarbeitern des Institutes für Pathologie hergestellt
Silikon, biokompatibel	NuSil Technology, Carpinteria, USA
Vidisic® Augengel	Bausch und Lomb GmbH, Berlin, D
Xylazin, Rompun® 20 mg/ml Injektionslösung für Tiere	Bayer Austria, Wien, A

Es ist zu beachten, dass die Reagenzien für die Färbungen nicht im Einzelnen aufgeführt sind, da diese Arbeiten nicht selbst durchgeführt wurden. Die entsprechenden Angaben sind jedoch in den Protokollen im Anhang 4 recherchierbar.

Anhang 3_Herleitung der Dimension der Konstante Q [$Fs^{(\alpha-1)}$]

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q(j\omega)^\alpha}$$

$$\begin{aligned} Q &\Rightarrow \left[\frac{1}{\Omega} \left(\frac{1}{s} \right)^{-\alpha} \right] \Rightarrow \frac{1}{\Omega} \frac{1}{\left(\frac{1}{s} \right)^\alpha} \Rightarrow \frac{1}{\Omega \left(\frac{1}{s} \right)^\alpha} \Rightarrow \frac{s}{s \Omega \left(\frac{1}{s} \right)^\alpha} \Rightarrow F \frac{1}{s \left(\frac{1}{s} \right)^\alpha} \\ &\Rightarrow F \frac{1}{s} \left(\frac{1}{s} \right)^{-\alpha} \Rightarrow F \left(\frac{1}{s} \right)^1 \left(\frac{1}{s} \right)^{-\alpha} \Rightarrow F \left(\frac{1}{s} \right)^{1-\alpha} \Rightarrow F \left(\frac{s}{1} \right)^{(-1)(1-\alpha)} \Rightarrow F s^{-1+\alpha} \\ &\Rightarrow \underline{\underline{F s^{\alpha-1}}} \end{aligned}$$

Anhang

Anhang 4_Protokolle

Vorlage für Protokoll: Stereotaxie-Operation

Tier.-Nr. #		Datum:	
Art der OP:			
Gewicht:			
Dosis „Mousemix“			
Start Anästhesie:			
Start OP:			
Ende OP:			
Koordinaten des Zielgebietes	anterior-posterior AP = _____ mm	medial-lateral ML = _____ mm	dorsal-ventral DV = _____ mm
korrigierte ³⁴⁾ Koordinaten	AP = _____ mm		DV = _____ mm
Bregma			Δ skull = _____
Relativ	- _____ mm	- _____ mm	- _____ mm
Absolut:			
Besonderheiten:			

³⁴⁾ bei Rattengewichten über 350 g

Vorlage für Protokoll: Apomorphin-induzierter Rotationstest

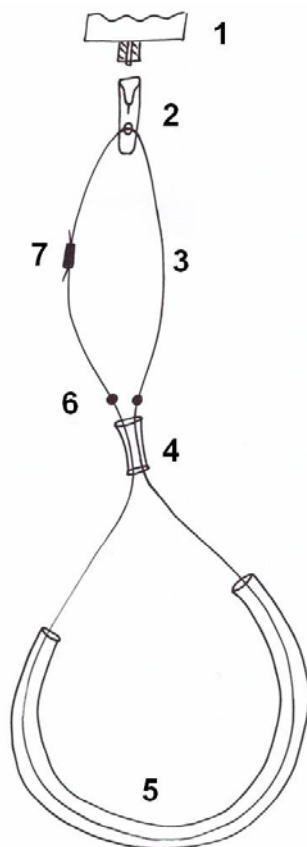
Datum:		Start:			Ende:				Ergebnis: [rpm]
Tier-Nr. #	Ge- wicht [g]	Dosis Injektions- lösung ³⁵⁾	Rotationen gesamt		Rotationen 1/60		Rotationen [min ⁻¹]		
			li (+)	re (-)	li (+)	re (-)	li (+)	re (-)	

Ansetzen der Injektionslösung und Berechnung der Dosis:

- pro Versuchstag wird eine neue Ampulle mit Apomorphin-Lösung angebrochen
- zum Ansetzen der Injektionslösung mit einer Pipette 0,1 ml aus einer frisch angebrochenen Ampulle entnehmen und in 5 ml 0,9%iger Kochsalzlösung gegeben
- die zu applizierende Menge errechnet sich wie folgt:

$$x \text{ ml Injektionslösung} = \frac{y \text{ g Körpergewicht} * 1,25 \text{ ml fertige Apomorphinlösung}}{1000 \text{ g}}$$

Skizze des Aufbaus der Fixationsschleife :



- 1 Rotor mit Aufnahmeaufsatz (männlicher Luer-Lock Anschluss)
- 2 handelsübliche Kanüle (weiblicher Luer-Lock Anschluss)
Die Kanüle wurde in der dazugehörigen Schutzhülle verklebt. Mittels einer „heißen Nadel“ (Kanülennadel mit Feuerzeug erhitzen) wurde ein Durchgangsloch zur Drahtdurchführung in die Schutzhülle eingebracht.
- 3 Draht: 1mm dickes Stahlvorfach, nylonummantelt (Angelbedarf)
- 4 Silikonschlauch, dünn: A Ø 2 mm (Angelbedarf)
- 5 Silikonschlauch, dick: A Ø 4 mm (Angelbedarf)
- 6 Gummistopfen (Angelbedarf)
- 7 Quetschöse (Angelbedarf)

³⁵⁾ 0,125ml fertige Injektionslösung pro 100g Körpergewicht Ratte

Anhang

Vorlage für Protokoll: Stepping-Test

	Tier Nr.								
	Datum								
Anzahl Schritte		Vorhand		Rückhand		Vorhand		Rückhand	
		links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts
	1. Messung								
	2. Messung								
	Mittelwert								
Initiierungszeit (s)		linke Pfote		rechte Pfote		linke Pfote		rechte Pfote	
	1. Messung								
	2. Messung								
	Mittelwert								

Vorlage für Protokoll: Korridor-Test

	Zeitpunkt	Prä Läsion (Post Läsion, Post Stimulation 3 Tage, Post Stimulation 3 Wochen,...)			
		Annäherungen			
Gruppe	Tier-Nr.	Links	Rechts	Annäherungen gesamt [n]	Kontralaterale. Annäherungen [%]
	Mittelwert				
	SD				
	SEM				

Vorlage für Protokoll: Offenfeld-Test

Rat ID	Total distance moved	Distance moved periphery	Distance moved center	Duration periphery	Duration center	Total duration	Mean velocity	Zone transition	Ratio: distance moved center/ total distance	Ratio: duration center/ total duration
	cm	cm	Cm	S	s	s	cm/s	n		
						600,04				
						600,04				

Protokoll: Nissl-Färbung³⁶

Histochemische Färbung nach Nissl mit (Kresylviolett) von 30µm dicken Kryostatschnitten von Rattenhirnen.

Prinzip:

Die Kresylviolett-Lösung färbt sogenannte Nissl-Körper oder Nissl-Schollen im Zytoplasma blau-violett an. Die RNA-haltige Nissl-Substanz ist charakteristisch für Nervenzellen. Die Färbung kann an formalinfixierten und Gefrierschnitten sowie an paraffineingebetteten Schnitten durchgeführt werden.

Durchführung:

1. Herstellung einer 0,1%igen, sauren Kresylviolett-Lösung (frisch ansetzen!):

Kresylechtviolett	0,1 g
destilliertes Wasser	100 ml
Eisessig	10 Tropfen

2. Filtration der Kresylviolett-Lösung (kurz vor Gebrauch filtrieren!)
3. Gewebeschnitt auf Objektträger in Kresylviolett-Lösung eintauchen (5 min)
4. Kurz in destilliertes Wasser eintauchen (10 s)
5. In Ethanol 96% eintauchen (Differenzierung durch partielle Entfärbung) (5 min)
6. Zwischendurch 2x herausnehmen und mikroskopisch die Farbintensität prüfen, um zu starke Entfärbung zu vermeiden
7. In Xylen (Dimethylbenzen) gut spülen (2 x 5 min)
8. Eindeckung der Objektträger in Leica Mount.

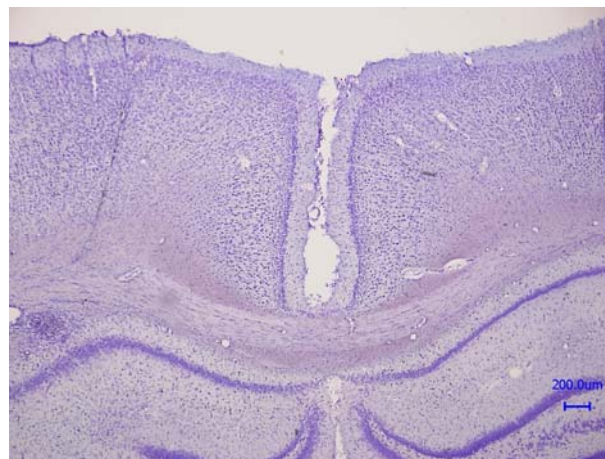


Abb. 45: Beispiel für Nissl-Färbung

³⁶ Protokoll erstellt von Franziska Alfen (MTA), Forschungslabor für experimentelle Neurologie und Neurobiologie, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock

Protokoll: ChAT-Färbung³⁷

Immunhistochemische Färbung (ABC Methode) von Cholinacetyltransferase (ChAT) mittels Diaminobenzidin- (DAB-) Visualisierung und Nickelionenverstärkung von 30 µm dicken Gefrierschnitten (Kryoschnitten) des Rattenhirns für die Färbung der Bereiche: CPu und PTg.

Die Schnitte liegen in Kryoprotektionslösung (30% Ethylenglycol und 25% Glycerol in Phosphat-gepufferter Saline (PBS)) bei -20°C vor. Die Färbung erfolgt im „Free floating“-Verfahren in 12 Well-Zellkulturschalen, wobei sich in jedem Well 3 Schnitte von 30 µm Dicke befinden. Um Antikörper (AK) und Detektionslösung zu sparen, wurden einige Schritte (Inkubationen mit dem Primär- und Sekundär- AK, sowie die mit ABC-, DAB- und Nickel-Lösungen) in „Toffifee“-Schalen, statt in Zellkulturschalen (Volumenbedarf: statt 1,5 - 2 ml pro Well nur 0,6 ml pro Well) durchgeführt.

Blanko Ausführung für variable Wellanzahl.

Tag 1 (ChAT-Färbung)

1.) Schnitte mittels Pinsel aus der Kryolösung in beschriftete Wells mit PBS geben

2.) Schnitte waschen

2 x 10 min in 2 ml PBS pro Well bei Raumtemperatur (RT) schütteln (90 rpm)

3.) Endogene Peroxidase blocken

15 min in 3% H₂O₂ (in PBS) bei RT schütteln (90 rpm)

Stammlösung 35% H₂O₂ → Verdünnung 1:11,7

2 ml pro Well x ____ Wells = ____ ml werden benötigt

1:11,7 ml

x : ____ ml x = ____ ml

→ ____ ml PBS + ____ ml 35% H₂O₂ = ____ ml

4.) Waschen (1) Entfernen des überschüssigen H₂O₂

10 min in 2 ml PBS pro Well bei RT schütteln (90 rpm)

5.) Waschen (2) Verbesserung der Epitopzugänglichkeit

10 min in 0,3% Triton X 100 (in PBS) bei RT schütteln (90 rpm)

Stammlösung 10% Triton X 100 → Verdünnung 1:33,3

2 ml pro Well x ____ Wells = ____ ml werden benötigt

1:33,3 ml

x : ____ ml x = ____ ml

→ ____ ml PBS + ____ ml 10% Triton X 100 = ____ ml

6.) Blocken von unspezifischen Bindungsstellen

1 h in 5% normales Kaninchenserum (normal rabbit serum, NRS) in PBS bei RT schütteln (70 rpm)

Stammlösung 100% NRS → Verdünnung 1:20

0,6 ml pro Well x ____ (Toffifee) = ____ ml werden benötigt

1:20 ml

x : ____ ml x = ____ ml

→ ____ ml PBS + ____ ml NRS = ____ ml

³⁷ Protokoll erstellt von Franziska Alfen (MTA), Forschungslabor für experimentelle Neurologie und Neurobiologie, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock

7.) Erste Antikörperinkubation

Primär-AK: Ziege (Goat) Anti-ChAT über Nacht bei 4°C schütteln (70 rpm)

Stammlösung → Verdünnung 1:200 in 1% NRS 0,2% Triton X 100 in PBS

0,6 ml pro Well x ____ Wells (Toffifee) = ____ ml werden benötigt

Ein Well nur mit PBS füllen als Negativkontrolle.

Antikörper

1:200 ml

x : ____ ml x = ____ ml = ____ µl Goat-Anti-ChAT-AK

NRS

1 : 100 ml

x : ____ ml x = ____ ml = ____ µl NRS

0,2% Triton X 100 in PBS (fertig angesetzt)

____ ml - ____ ml - ____ ml = ____ ml

→ ____ ml 0,2% Triton X 100 in PBS + ____ ml Goat-Anti-ChAT-AK + ____ ml NRS

Tag 2 (ChAT-Färbung)

8.) Waschen

2 x 10 min in 2 ml PBS pro Well bei RT schütteln (90 rpm)

9.) Zweite Antikörperinkubation

Sekundär-AK (biotinyliert): Kaninchen (Rabbit) Anti-Goat-IgG (Vectastain Elite) über Nacht bei 4°C schütteln (70 rpm, oder 2h RT)

Stammlösung → Verdünnung 1:250 in 1% NRS 0,2% Triton X 100 in PBS

0,6 ml pro Well x ____ Wells (Toffifee) = ____ ml werden benötigt

Antikörper

1:250 ml

x : ____ ml x = ____ ml = ____ µl Rabbit-Anti-Goat-IgG-AK

NRS

1:100 ml

x : ____ ml x = ____ ml = ____ µl NRS 100%

0,2% Triton X 100 in PBS (fertig angesetzt)

____ ml - ____ ml - ____ ml = ____ ml

→ ____ ml 0,2% Triton X 100 in PBS + ____ ml Rabbit-Anti-Goat-IgG-AK
+ ____ ml NRS

Tag 3 (ChAT-Färbung)

10.) Vorbereitung der ABC-Lösung

Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC-Kit, Vectastain Elite) vorbereiten durch 30 min Vorinkubation bei RT auf Magnetrührer

0,6 ml pro Well x ____ Wells (Toffifee) = ____ ml werden benötigt

Solution A 1:50 + Solution B 1:50 in PBS

1:50 ml

x : ____ ml x = ____ ml = ____ µl Solution A bzw. B

→ ____ ml PBS + ____ µl Solution A + ____ µl Solution B = ____ ml

11.) Waschen

2 x 10 min in 2 ml PBS pro Well bei RT schütteln (90 rpm)

12.) ABC-Inkubation

1 h in ABC-Lösung bei RT schütteln (70 rpm)

0,6 ml der vorbereiteten Lösung (Toffifree, siehe unter 10.) werden in Wells eingefüllt und die Schnitte überführt

13.) Waschen

2 x 10 min in 2 ml PBS pro Well bei RT schütteln (90 rpm)

14.) Vorbereitung **DAB-Lösung** aus KIT

1.	H ₂ O dest	20ml	
	+Buffer stock	8	Tropfen→ Mischen
2.	+DAB stock	16	Tropfen→ Mischen
3.	+Hydrogen Peroxidase Solution	8	Tropfen→ Mischen
4.	+Nickel Solution	8	Tropfen→ Mischen

Lösung in Wells geben, Schnitte hinzu; Färbung sehr stark: **2-5 min** reichen aus.

15.) Färbereaktion abstoppen durch Überführen der Schnitte in eine neue Platte mit PBS

10 min in 2 ml PBS bei RT schütteln (90 rpm)

16.) nochmaliges **Waschen in 2 ml PBS**, da Schnitte noch nachfärben

Schnitte können bei 4°C und 70 rpm mehrere Tage gelagert werden

17.) Aufziehen der gefärbten Schnitte auf Objektträger (OT)

**Schnitte in Schale mit 1 x PBS 1:10 verdünnt geben und mit Pinsel auf OT platzieren
(3 Schnitte pro OT in richtiger Reihenfolge: siehe Paxinos und Watson [2007])**

18.) Trocknen

OT 30 min oder über Nacht bei RT lufttrocknen lassen

19.) Eindecken vorbereiten

2 x 5 min in Xylen (Dimethylbenzen) gut spülen

20.) Eindecken: **mit Deckgläschen in Leica Mount eindecken**

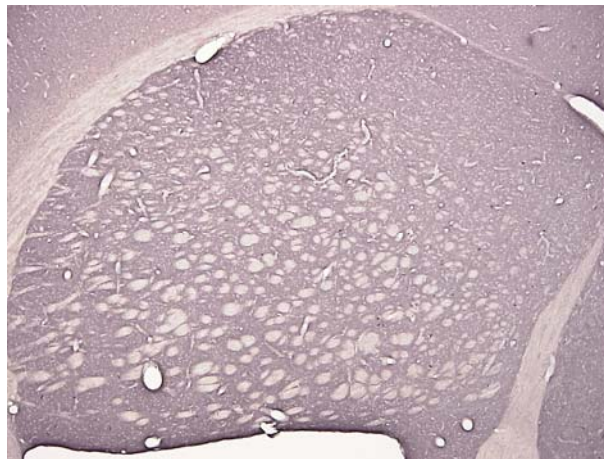


Abb. 46: Beispiel für ChAT-Färbung

Protokoll: TH-Färbung³⁸

Immunhistochemische Färbung (ABC Methode) von TH mittels DAB-Visualisierung und Nickelionenverstärkung von 30 µm dicken Kryoschnitten des Rattenhirns (Färbung der Bereiche SN und PTg).

Vorbereitung siehe ChAT-Protokoll.

Tag 1 (TH-Färbung)

1.) Schnitte mittels Pinsel aus der Kryolösung in beschriftete Wells mit PBS geben

2.) Schnitte waschen

2 x 10 min in 2 ml PBS pro Well bei RT schütteln (90 rpm)

3.) Endogene Peroxidase blocken

15 min in 3% H₂O₂ (in PBS) bei RT schütteln (90 rpm)

Stammlösung 35% H₂O₂ → Verdünnung 1:11,7

2 ml pro Well x ____ Wells = ____ ml Endvolumen werden benötigt

1:11,7 ml

x: ____ ml Endvolumen x = ____ ml 35% H₂O₂

→ ____ ml PBS + ____ ml 35% H₂O₂ = ____ ml Endvolumen

4.) Waschen (1) Entfernen des überschüssigen H₂O₂

2 x 10 min in 2 ml PBS pro Well bei RT schütteln (90 rpm)

5.) Blocken von unspezifischen Bindungsstellen

1 h in 3% BSA biotinfrei + 1:67 normales Pferdeserum (normal horse serum, NHS) in 0,05%

Triton X 100 in PBS bei RT schütteln (70 rpm)

0,6 ml pro Well x ____ (Toffifee) = ____ ml Endvolumen werden benötigt

3% BSA in 0,05% Triton X 100 in PBS

3% = 3 g : 100 ml

x : ____ ml Endvolumen x = ____ g BSA

→ ____ g BSA einwiegen und in ____ ml 0,05% Triton X 100 in PBS lösen,
auf dem Magnetrührer erhitzen und rühren lassen

NHS

1:67

x : ____ ml Endvolumen x = ____ ml 100% NHS

→ ____ ml 3% BSA in 0,05% Triton X 100 in PBS + ____ ml 100% NHS
= ____ ml Endvolumen

³⁸ Protokoll erstellt von Franziska Alfen (MTA), Forschungslabor für experimentelle Neurologie und Neurobiologie, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock

6.) Erste Antikörperinkubation

Primär-AK: Maus (mouse) Anti-TH über Nacht bei 4°C schütteln (70 rpm)

Stammlösung → Verdünnung 1:1000 in 1% BSA 0,025% Triton X 100 in PBS

0,6 ml pro Well x ____ Wells (Toffifee) = ____ ml Endvolumen werden benötigt

Ein Well mit PBS füllen als Negativkontrolle. 1% BSA in 0,025% TX in doppelter Menge ansetzen, da es auch für die Zweitantikörperinkubation benötigt wird.

BSA

1% = 1 g : 100 ml

x : ____ ml Endvolumen x = ____ g BSA

→ 2 x ____ g BSA einwiegen und in 2 x ____ ml 0,025% Triton X lösen,
rührend auf Magnetrührer erhitzen, vor Benutzung auf RT abkühlen lassen

Antikörper

1:1000

x: ____ ml Endvolumen

x = ____ ml = ____ µl Mouse-Anti-TH-AK

→ ____ ml 1% BSA in 0,025% Triton X 100 + ____ ml Mouse-Anti-TH-A
= ____ ml Endvolumen

Tag 2 (TH-Färbung)

7.) Waschen: 2 x 10 min in 2 ml PBS pro Well bei RT schütteln (90 rpm)

8.) Zweite Antikörperinkubation

Sekundär-AK biotinyliert: Pferd (horse) Anti-Mouse-IgG (Vectastain Elite) über Nacht bei 4°C schütteln (70 rpm, oder 2h bei RT)

Stammlösung → Verdünnung 1:200 in 1% BSA 0,025% Triton X 100 in PBS

0,6 ml pro Well x ____ Wells (Toffifee) = ____ ml Endvolumen werden benötigt

Antikörper

1:200 ml

x: ____ ml

x = ____ ml = ____ µl Horse-Anti-Mouse-IgG-AK

→ ____ ml 1% BSA in 0,025% Triton X 100 + ____ ml Horse-Anti-Mouse-IgG-AK
= ____ ml Endvolumen

Tag 3 (TH-Färbung)

9.) Vorbereitung der ABC-Lösung

Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC-Kit, Vectastain Elite) vorbereiten durch 30 min Vorinkubation bei RT auf Magnetrührer

0,6 ml pro Well x ____ Wells (Toffifee) = ____ ml Endvolumen werden benötigt

Solution A 1:50 + Solution B 1:50 in PBS

1: 50 ml

x: ____ ml

x = ____ ml = ____ µl Solution A bzw. B

→ ____ ml PBS + ____ µl Solution A + ____ µl Solution B = ____ ml Endvolumen

10.) Waschen: 2 x 10 min in 2 ml PBS pro Well bei RT schütteln (90 rpm)

11.) ABC-Inkubation

1 h in ABC-Lösung bei RT schütteln (70 rpm)

0,6 ml der vorbereiteten Lösung (Toffifee, siehe unter 10.) werden in Wells eingefüllt und die Schnitte überführt

12.) Waschen

2 x 10 min in 2 ml PBS pro Well bei RT schütteln (90 rpm)

13.) Vorbereitung **DAB-Lösung** aus KIT

1.	H2O dest	20ml	
	+Buffer stock	8	Tropfen→ Mischen
2.	+DAB stock	16	Tropfen→ Mischen
3.	+Hydrogen Peroxidase Solution	8	Tropfen→ Mischen
4.	+Nickel Solution	8	Tropfen→ Mischen

Lösung in Wells geben, Schnitte hinzu; Färbung sehr stark: **2-5 min** reichen.

15.) Färbereaktion abstoppen durch Überführen der Schnitte in eine neue Platte mit PBS

10 min in 2 ml PBS bei RT schütteln (90 rpm)

16.) nochmaliges **Waschen in 2 ml PBS**, da Schnitte noch nachfärben

Schnitte können bei 4°C und 70 rpm mehrere Tage gelagert werden

17.) Aufziehen der gefärbten Schnitte auf OT

**Schnitte in Schale mit 1 x PBS 1:10 verdünnt geben und mit Pinsel auf OT platzieren
(3 Schnitte pro OT in richtiger Reihenfolge: siehe Paxinos und Watson [2007])**

18.)Trocknen

30 min OT bei RT lufttrocknen

19.) Eindecken vorbereiten

2 x 5 min in Xylen (Dimethylbenzen) gut spülen

20.) Eindecken

mit Deckgläschen in Leica Mount eindecken

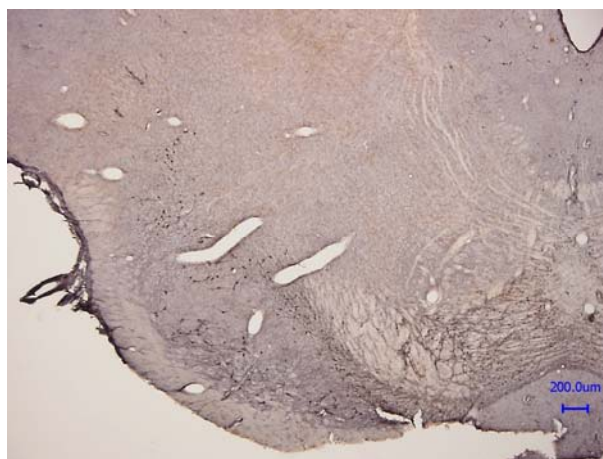


Abb. 47: Beispiel für TH-Färbung

Protokoll: Anfertigung von Kryostatschnitten

Gehirne fixieren und entwässern

- nach Abschluss der Versuche werden die Ratten mit Paraformaldehyd perfundiert und die Gehirne entnommen
- Falcons mit Paraformaldehyd füllen und beschriften
- Gehirne in die Falcons überführen und bei 4°C über Nacht, max. 2 Tage fixieren (ansonsten Gefahr der Überfixierung, schlecht für AK- Bindung)
- danach Gehirne in 20% Sucrose (Haushaltszucker) in PBS überführen über Nacht bei 4°C bis Hirne abgesunken sind

Gehirne tieffrieren

- Kryostat 30 min vor Beginn der Arbeit auf -30°C stellen
- kleine quadratische Alufolien vorbereiten und in den Kryostaten legen, kleine Papierschnipsel mit entsprechenden Tiernummern beschriftet (Bleistift) ebenso
- Isopentan (bei -80°C in mehreren kleinen Flaschen zu 250 ml lagern) in einen Plastikbecher füllen, der in einem Styroporzylinder steht und in den Kryostaten stellen
- Temperatur messen: Soll: ca. -50°C bis -60°C
- die Sucrose aus dem Falcon mit dem Gehirn vorsichtig über dem Abguss ausschütten
- Falcon in den Kryostaten legen
- Hirn vorsichtig mit Pinzette herausnehmen und auf ein Küchentuch abtupfen
- Gehirne für 5 min in -50°C bis -60°C kaltes Isopentan geben
- danach vorsichtig auf Küchentuch legen (um letzte Feuchtigkeit aufzusaugen)
- Gehirne auf die zugeschnittene Alufolie legen und zusammen mit einem Papierzettel mit der Tiernummer einwickeln
- Alufoliepaket mit der Tiernummer beschriften
- in beschrifteten Pappkartons (mit Gruppenbezeichnung) bei -80°C lagern
- Isopentan zurückschütten (kann wiederverwendet werden)

Kryoschnitte anfertigen

- Kryoprotektionslösung ansetzen:
 - o 30% Ethylenglycol
 - o 25% Glycerin
 - o in PBS gelöst

→ 1 l: 300 ml Ethylenglykol + 250 ml Glycerin auf 1 l auffüllen mit PBS
- die Gehirne sollte ca. 30 min ruhen bevor sie geschnitten werden (in der Zeit alles vorbereiten)
- Tissue Tek auf den Pilz geben (RT) und einen Zylinder gerade daraufsetzen (wichtig für *flat skull* Position des Gehirnes) und im Kryostaten anfrieren
- ein Tropfen Tissue Tek innen an den Rand des Zylinders geben
- das Gehirn mit einer Pipette greifen und mit der langen Stirnseite an den inneren Rand des Zylinders möglichst gerade aufsetzen (optische Kontrolle, notfalls nachjustieren) und anfrieren lassen
- wenn komplett angefroren, dann vorsichtig den Zylinder durch leichtes Drehen entfernen
- das Gehirn mit Tissue TEK nochmals „Ummanteln“ und anfrieren
- Pilz einspannen und ausjustieren, dass der Anschnitt genau gerade erfolgt
- an der rechten Seite mit einer Klinge den Cortex anschneiden, um später die Ausrichtung der Schnitte zu ermitteln
- später wenn der äußere Bereich sich vom Schnitt löst (im Bereich Sth/SN), mit einer Kanüle mittig im Gehirn rechts einstechen
- Klinge Einsetzen
- Schnittdicke 30µm einstellen

- Kammertemperatur 21°C, OT 17-18°C
- Winkel 0-3°C
- solange anschneiden bis man sich im gewünschten Bereich befindet
- die Schnitte mit einem Pinsel, den man immer mit PBS spült, in wells mit Kryoprotektionslösung überführen
- dabei das Schneideschema einhalten
- wenn Pause dann Alufolie auf das Gehirn

Die Schnitte in den Wells mit Kryoprotektionslösung können in Alufolie umwickelt bei -20° über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

Protokoll: Kontrastierung mit Osmiumtetroxid

Osmiumtetroxid ist ein gängiges Kontrastmittel, das zum Anfärben von biologischem Material verwendet wird, das mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht werden soll.

Als Faustregel gilt: Kontrastierung von 3 mm Gewebedicke pro Stunde möglich.

- Prinzipiell gilt: Gebiet des Interesses (Elektroden-Gewebe-Kontaktzone) möglichst gut freipräparieren und möglichst wenig mechanisch beanspruchen
- dazu Hirn nach Perfusion mit 3,7%iger Paraformaldehydlösung von ventral frei präparieren und in Kalotte des Schädeldachs belassen
- mit scharfem Skalpell vorsichtig Gewebe um die Elektrode abtragen (bis auf ca. 2 mm um den Elektrodenschaft)
- Proben nach 24 h aus der 3,7%iger Paraformaldehydlösung nehmen und für 2 h in Osmiumtetroxidlösung auf dem Plattformschüttler sanft (!) bewegen (gilt für alle folgenden Spülschritte)
- danach 3 x 10 min mit Aqua dest. spülen
- Danach Entwässerung:
 - o 10 min spülen in 30%igem Ethanol
 - o 15 min spülen in 50%igem Ethanol
 - o 30 min spülen in 70%igem Ethanol (wegkippen, neu auffüllen und Lagerung über Nacht in 70%igem Ethanol)
 - o 45 min spülen in 90%igem Ethanol
 - o 1 h spülen in 100%igem Ethanol

Danach erfolgt die Einbettung in Epoxidharz.

Publikationen

Zeitschriftenaufsätze

Badstübner K, Weber I, Gimsa U, Benecke R, Mix E und Gimsa J. *Deep brain stimulation of hemiparkinsonian rats with unipolar and bipolar electrodes for up to 6 weeks – behavioral testing of freely moving animals*. J Neurosci Res. (in Vorbereitung)

Badstübner K, Kröger T, Mix E, Stubbe M, Gimsa J. *The DC-resistivity detected around deep brain stimulation-electrodes reflects the encapsulation process in an animal model*. J Neurosci Methods. (in Vorbereitung)

Göttsche J, Hoffschmidt B, Schmitz S, Sauerborn M, Buck R, Teufel E, Badstübner K, Ifland D, Rebholz C. 2009. *Solar Concentrating Systems Using Small Mirror Arrays*. J. Sol. Energy Eng. 132:011003–011003.

Kapitel in einem Fachbuch

Badstübner K, Kröger T, Mix E, Gimsa U, Benecke R, Gimsa J. 2013. *Electrical Impedance Properties of Deep Brain Stimulation Electrodes during Long-Term In-Vivo Stimulation in the Parkinson Model of the Rat*, in: Gabriel J, Schier J, Van Huffel S, Conchon E, Correia C, Fred A, Gamboa H, (Eds.), Biomedical Engineering Systems and Technologies. Berlin, Heidelberg: Springer. 357:287–297. ISBN: 978-3-642-38255-0.

Ansorge F, Badstübner K, Reichel H. 2008. *Novel Rapid Prototyping Processes – Building Movable Parts*, in: Bartolo PJ, Mateus AJ, Batista F, Almeida HA, Matias JM, Vasco JC, Gaspar JB, Correia MA, Andre NC, Alves NF, Novo PP, Martinho PG, Carvalho RA, (Eds.), Virtual and Rapid Manufacturing, Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping. London: Taylor & Francis Group. 665–666. ISBN: 978-0-415-41602-3.

Fachvorträge

Badstübner K, Kröger T, Mix E, Gimsa U, Benecke R, Gimsa J. 2012. *Characterization of the Encapsulation Process of Deep Brain Stimulation Electrodes Using Impedance Spectroscopy in a Rodent Model*. In: Proceedings of the 5th International Conference on Bio-inspired Systems and Signal Processing, Vilamoura, Portugal. 125–130. ISBN: 978-989-8425-89-8.

Badstübner K, Kröger T, Weber I, Schmidt C, Mix E, Gimsa U, van Rienen U, Benecke R, Gimsa J. 2013. *Characterization of the Encapsulation Process of Uni- and Bipolar Deep Brain Stimulation Electrodes Using Electrical Impedance Spectroscopy in the Rat*. Gehalten auf dem 6th International Workshop on Impedance Spectroscopy, Chemnitz, Deutschland.

Posterbeiträge

Badstübner K, Weber I, Nowak K, Gimsa U, Kröger T, Benecke R, Gimsa J, Mix E. 2014. *Long-term Effects of Deep Brain stimulation on the Behavior of Freely Moving Hemiparkinsonian Rats*. Gezeigt auf dem 9th FENS Forum of Neuroscience, Mailand, Italien.

Badstübner K, Weber I, Nowak A, Gimsa U, Kröger T, Benecke R, Gimsa J, Mix E. 2013. *Persistent Beneficial Effects of DBS in Behavioral Tests with Freely Moving Hemiparkinsonian Rats*. Gezeigt auf dem FENS Featured Regional Meeting, Prag, Tschechische Republik. ISBN 978-80-260-4881-7.

Badstübner K, Weber I, Busch A, Warkentin M, Gimsa U, Behrend D, Benecke R, Gimsa J, Mix E. *Functional and Morphological Long-term Effects of DBS in 6-OHDA Hemiparkinsonian Rats*. Program No. 692.20. 2014 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.

Patente

Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V., 2009. *Verfahren zur Herstellung einer funktionellen Baueinheit und funktionelle Baueinheit*. Erfinder: Badstübner K, Ansorge F. 04.06.2009. Anmeldung: 20.02.2006. DE, Patentschrift DE102006008332B4.

Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V., 2007. *Method for the Production of a Functional Constructional Unit, and Functional Constructional Unit*. Erfinder: Badstübner K, Ansorge F. 18.01.2007. Anmeldung: 30.06.2006. US, Patentschrift US000008481864B2.

Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V., 2006. *Verfahren zur Herstellung eines Gegenstandes mit mindestens zwei beweglichen Bauteilen*. Erfinder: Beck J, Badstübner K, Ansorge F. 07.12.2006. Anmeldung: 02.06.2006. WO, Patentschrift WO002006128736A9.